

Keanekaragaman Genetika Pisang Ber genom B Berdasarkan Penanda Mikrosatelit

(Genetic Diversity of Banana with B Genom Using Microsatellite Marker)

Windarti Wahyuningtyas, Amin Retnoningsih, Enni Suwarsi Rahayu
Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang
Kampus Sekaran, Gunung Pati, Semarang 50229

ABSTRACT

The morphology and isozyme marker was not enough to reveal banana genetic diversity. So, it needs molecular analysis. The purpose of this research is to know the genetic diversity of banana with B genome using microsatellite marker. Forty bananas with B genom from Yogyakarta Agriculture Service and Animal Husbandary Service and also from Tropical Fruit Centre of Bogor Agriculture Institute were amplified using 6 loci (MaCIR327b, MaCIR108, Ma-3-139, Ma-3-90, Ma-1-17, and Ma-1-27). The diversity were identified with allele amount, genotype, observe heterozigosity, and filogeny. There are eight allele per locus average from six microsatellites. MaCIR108 produced the highest allele amount, there are 13 alleles. The research identified 75 genotypes. MaCIR327b, MaCIR108, Ma-3-139, Ma-3-90, Ma-1-17, and Ma-1-27, respectively, produced 8, 20, 13, 14, 15, and 5 alleles. The H_o average is quite high, there are 0,77. The similarity coefficient is between 0,597 – 1,00. MaCIR108 and Ma-3-90 can be used to identify banana group genom. As a group genom characteristic, Ma-1-17 needs more research. Identification result between morphology and microsatelite marker were different. Based on morphology marker, Sri Wulan and Byar cultivar were ABB, and Ketip Gunung Sari were AAB, but based on microsatelite marker Sri Wulan and Byar cultivar were AAB, while Ketip Gunung Sari has not B on its genom.

Keywords: genetic diversity, banana, microsatelit.

PENDAHULUAN

Wilayah Indonesia merupakan salah satu pusat penyebaran plasma nutfah pisang dengan keanekaragaman yang besar (Nasution & Yamada 2001). Dua jenis penting yang menjadi tetua kultivar pisang adalah *Musa acuminata* (AA) dan *Musa balbisiana* (BB). Dari kedua jenis pisang tersebut timbul berbagai variasi genetika melalui proses-proses yang berperan penting dalam evolusi tanaman pisang. Evolusi terjadi melalui mutasi (INIBAP 2003), seleksi manusia (Kaemmer *et al.* 1997), persilangan sendiri di dalam jenis maupun antar jenis serta persilangan balik dengan induknya (Simmonds 1995). Evolusi pisang liar tersebut menghasilkan kultivar pisang dengan berbagai tingkat ploidi (diploid, triploid, dan tetraploid) dengan variasi kombinasi genom AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AB BB, AAAB, dan AAB B (Stover dan Simmonds 1987, Pillay *et al.* 2006), serta genom BBB dari evolusi dua jenis pisang liar BB (Valmayor *et al.* 2000). Kelompok genom BB banyak ditemukan hanya di

wilayah pusat asal *M. balbisiana* (PROMUSA 2002).

Secara alamiah populasi kultivar pisang adalah bentuk triploid AAA, AAB, dan ABB. Pisang ber genom AAB dan ABB merupakan kultivar pisang yang paling banyak dibudidayakan. Kelompok pisang ini dapat dikonsumsi secara langsung maupun diolah terlebih dahulu dan dimanfaatkan untuk tujuan lain. Selain itu, kultivar pisang ber genom AAB dan ABB diduga memiliki sifat ketahanan terhadap penyakit dan toleran pada lingkungan marginal yang diturunkan dari tetuanya *M. balbisiana* (BB) (Simmonds 1962). Keunggulan-keunggulan pisang ber genom B memberikan peluang untuk mencari sifat atau karakter yang dapat dimanfaatkan dalam perbaikan kualitas dan kuantitas produksi. Untuk itu diperlukan informasi keanekaragaman genetika pisang ber genom B (AAB, ABB, dan BB) sebagai data awal dalam program pemuliaan pisang.

Permasalahan yang dikaji adalah apakah terdapat keanekaragaman genetika pisang

bergenom B berdasarkan penanda mikrosatelit. Keanekaragaman yang diteliti khususnya jumlah dan rata-rata alel per lokus, genotipe, nilai heterozigositas pengamatan, hubungan kekerabatan, dan adanya alel pada lokus tertentu yang dapat menjadi penciri pisang bergenom B. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keanekaragaman genetika pisang bergenom B secara molekuler berdasarkan penanda mikrosatelit.

Analisis keanekaragaman genetika pisang secara sederhana telah dilakukan menggunakan penanda morfologi (Jumari & Pudjoarinto 2000, Siddiqah 2002). Keanekaragaman morfologi relatif mudah diidentifikasi, namun ekspresinya sangat dipengaruhi oleh lingkungan (Rao 2004). Penanda morfologi memiliki keterbatasan karena memerlukan informasi karakter bagian vegetatif (batang semu, daun, anakan, dan lain-lain) dan bagian generatif (bunga, buah, dan biji) sehingga baru dapat diamati setelah tanaman dewasa (Jumari & Pudjoarinto 2000).

Metode lain yang digunakan untuk menganalisis keanekaragaman genetika pisang adalah penanda isozim (Megia *et al.* 2001). Penanda ini memiliki kelebihan karena bersifat kodominan. Keterbatasan penanda ini adalah rendahnya kemampuan dalam mendeteksi polimorfisme (Rao 2004). Beberapa sistem enzim tertentu dipengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan yang dibatasi umur dan jenis jaringan (Azrai 2005). Variasi triplet kodon yang mengkode satu asam amino yang sama juga menunjukkan keterbatasan dalam mendeteksi polimorfisme.

Penanda molekuler mempunyai beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan penanda morfologi dan isozim. Penanda molekuler sering berada di dekat gen sehingga dapat membantu menentukan posisi suatu gen (Muladno 2002). Selain itu penanda molekuler juga menunjukkan polimorfisme yang tinggi sehingga dapat mendeteksi keanekaragaman genetika antar jenis maupun di dalam jenis. Mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeat* (SSR) merupakan salah satu contoh penanda molekuler. Penanda mikrosatelit bersifat polimorfik, multi alel, kodominan, *reproducible*, mudah untuk diinterpretasikan dan diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sehingga banyak diminati (Crouch *et al.* 1999). Penanda ini tepat untuk menganalisis keanekaragaman genetika pisang yang memiliki struktur genom kompleks akibat adanya persilangan sendiri, mutasi, maupun

seleksi manusia. Karena genom yang kompleks, keanekaragaman genetika pisang tidak selalu dapat diidentifikasi menggunakan penanda morfologi maupun biokimia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang dan Laboratorium Tumbuhan Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati & Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret – Juli 2006.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 40 kultivar pisang bergenom B koleksi Kebun Plasma Nutfah Pisang Dinas Pertanian dan Peternakan (Diperta) Yogyakarta dan Pusat Kajian Buah-buahan Tropis (PKBT) Institut Pertanian Bogor (IPB) (Tabel 1). Jenis organ berupa kuncup daun pisang yang masih menggulung (muda) untuk memudahkan dalam proses preparasi isolasi DNA sehingga dapat diperoleh DNA dalam jumlah banyak. Penelitian ini menggunakan empat jenis primer (Ma-1-17, Ma-1-27, MaCIR108, dan MaCIR327b) yang digunakan oleh Kaemmer *et al.* (1997) dan dua jenis primer (Ma-3-90 dan Ma-3-139) yang digunakan oleh Crouch *et al.* (1998) (Tabel 2). Alat dan bahan yang digunakan disajikan dalam Tabel 3 dan Tabel 4.

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah pengambilan bahan tanaman, isolasi dan purifikasi DNA, amplifikasi mikrosatelit dengan PCR, elektroforesis gel poliakrilamid vertikal, pewarnaan gel poliakrilamid dengan pewarna perak, dan analisis data. Data dianalisis berdasarkan profil DNA yang ditandai adanya pita yang muncul pada gel berdasarkan ukuran produk PCR pada lokus tertentu.

Genotipe setiap kultivar ditentukan dengan melihat perbedaan migrasi alel. Lokus dan alel diberi lambang alfanumerik mengikuti *International Maize and Wheat Improvement Center* (2004). Ukuran lokus berturut-turut diberi lambang a, b, c, d, e, dan f mulai dari yang paling panjang sampai paling pendek. Alel diberi lambang sesuai lambang setiap lokus dan dibawahnya diikuti angka 1, 2, 3, dan seterusnya yang menunjukkan urutan ukuran alel. Heterozigositas pengamatan (Ho) dihitung berdasarkan rasio antara jumlah individu

bergenotipe heterozigot dengan jumlah seluruh kultivar yang dianalisis.

Data alel diterjemahkan menjadi data biner. Setiap alel mewakili satu karakter dan diberi nilai berdasarkan ada tidaknya suatu alel. Jika terdapat alel diberi nilai 1 (satu) dan jika tidak terdapat alel diberi nilai 0 (nol). Hubungan kekerabatan dianalisis melalui UPGMA (*Unweighted Pair*

Group Method with Arithmetic Mean) program NTSYSpC (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) versi 2.02 (Rohlf 1998). Koefisien kemiripan genetika antar kultivar pisang diolah menggunakan prosedur SIMQUAL dan dihitung berdasarkan *Dice Coefficient* dari Sneath dan Sokal (1973).

Tabel 1. Kultivar pisang yang dianalisis beserta grup genom berdasarkan morfologi dari koleksi Diperta Yogyakarta dan PKBT IPB

No.	Kultivar pisang	Grup genom berdasarkan morfologi	Koleksi	No.	Kultivar pisang	Grup genom berdasarkan morfologi	Koleksi
1.	Raja Nangka	AAB	Diperta Yogyakarta	21.	Sobo Londoijo	ABB	Diperta Yogyakarta
2.	Longong	AAB	Diperta Yogyakarta	22.	Raja Bagus	AAB	Diperta Yogyakarta
3.	Raja Lini	AAB	Diperta Yogyakarta	23.	Kepok Lumut	ABB	Diperta Yogyakarta
4.	Sri Wulan	ABB	Diperta Yogyakarta	24.	Batu	BB	Diperta Yogyakarta
5.	Raja Pendopo	ABB	Diperta Yogyakarta	25.	Kepok Awu	ABB	Diperta Yogyakarta
6.	Raja Endog	ABB	Diperta Yogyakarta	26.	Raja Bandung	ABB	Diperta Yogyakarta
7.	Ketip Gn. Sari	AAB	Diperta Yogyakarta	27.	Siam Paris	ABB	PKBT IPB
8.	Kepok Asam	ABB	Diperta Yogyakarta	28.	Gablok	ABB	Diperta Yogyakarta
9.	Raja Bali	ABB	Diperta Yogyakarta	29.	Susu	AAB	PKBT IPB
10.	Sobo Kerik	ABB	Diperta Yogyakarta	30.	Kepok Amerika	AAB	Diperta Yogyakarta
11.	Gedah	ABB	Diperta Yogyakarta	31.	Raja Sableng	AAB	Diperta Yogyakarta
12.	Pulut	AAB	Diperta Yogyakarta	32.	Kepok Ladrang	ABB	Diperta Yogyakarta
13.	Kepok Gandul	ABB	Diperta Yogyakarta	33.	Kepok Urang	ABB	Diperta Yogyakarta
14.	Koja Santen	AAB	Diperta Yogyakarta	34.	Raja Santen	AAB	Diperta Yogyakarta
15.	Abu Awak	ABB	Diperta Yogyakarta	35.	Austroli	AAB	Diperta Yogyakarta
16.	Wangu	ABB	Diperta Yogyakarta	36.	Raja Kasman	AAB	Diperta Yogyakarta
17.	Raja Sereh	AAB	Diperta Yogyakarta	37.	Kepok Byar	ABB	Diperta Yogyakarta
18.	Sobo Kapuk	ABB	Diperta Yogyakarta	38.	Byar	ABB	Diperta Yogyakarta
19.	Kepok Brot	ABB	Diperta Yogyakarta	39.	Kaso	ABB	Diperta Yogyakarta
20.	Bangkauhu	AAB	Diperta Yogyakarta	40.	Gandul	ABB	Diperta Yogyakarta

Tabel 2. Urutan basa, jumlah basa, dan suhu *annealing* masing-masing primer yang digunakan dalam penelitian

No	Lokus	Urutan Basa (5' - 3')		Jumlah Basa	Suhu <i>Annealing</i>
1	Ma-1-17	F	AGGCGGGGAATCGGTAGA	18	55 °C
		R	GGCGGGAGACAGATGGAGT	19	
2	Ma-1-27	F	TGAATCCCAAGTTTGGTCAAG	21	55 °C
		R	CAAAACACTGTCCCCATCTC	20	
3	Ma-3-90	F	GCACGAAGAGGCATCAC	17	55 °C
		R	GGCCAAATTTGATGGACT	18	
4	Ma-3-139	F	ACTGCTGCTCTCCACCTCAAC	21	55 °C
		R	GTCCCCCAAGAACCATATGATT	22	
5	MaCIR108	F	TTTGATGTCACAATGGTGTTC	22	55 °C
		R	TTAAAGGTGGGTTAGCATTAGG	22	
6	MaCIR327b	F	AAGTTAGGTCAAGATAGTGGGATTT	25	50 °C
		R	CTTTTGCACCAGTTGTTAGGG	21	

Tabel 3. Bahan penelitian

Uraian	Bahan
Isolasi dan purifikasi DNA	Bahan tanaman (daun pisang yang masih menggulung), <i>buffer extract</i> , SDS 20%, 5M Kalium asetat, TE, Kloroform Isoamil Alkohol (KIAA), isopropanol, etanol 70%, RNAase.
Amplifikasi dengan mesin PCR	DNA tanaman pisang, primer, <i>buffer</i> , <i>taq polimerase</i> , dNTP, dan <i>ultrapure</i> .
Gel agarose 0,8% dan buffer	1x <i>buffer</i> TAE (tris base, air destilasi, asam asetat glasial, EDTA 0,5 M pH 8,0), Ethidium bromida, agaros, <i>loading dye</i> .
Gel poliakrilamid 6% dan buffer	DNA standar 100 bp, <i>loading dye</i> , 30% poliakrilamid (akrilamid, bis akrilamid, <i>ultrapure</i>), 5x <i>buffer</i> TBE (Tris base 445 mM, asam borat 445 mM, 10 mM EDTA), 10% APS, TEMED, urea, <i>ultrapure</i> , <i>bind silane</i> , <i>sigmacote</i> , etanol 95%.
Pewarna perak	Etanol 10%, asam asetat glasial 1%, air destilasi, 1,5% asam nitrat, 0,2% AgNO ₃ (perak nitrat), 30 gr/L Na ₂ CO ₃ , 37% formaldehid, 5% asam asetat glasial.

Tabel 4. Alat penelitian

Uraian	Alat
Pengambilan kuncup daun	Gunting yang tajam dan bersih
Penyimpanan dalam perjalanan	Plastik klip bersih, tempat film
Penyimpanan sebelum isolasi DNA	Almari pendingin (4 °C)
Isolasi dan purifikasi DNA	Gunting, pinset, <i>gloves</i> , <i>mortar</i> dan <i>pestle</i> , mikropipet, tip, <i>ependorf</i> , <i>falcon</i> 15 ml, <i>shaking waterbath</i> , sentrifus, rak <i>ependorf</i> .
Amplifikasi DNA	Mesin <i>thermal cycle</i> , <i>ependorf</i> , mikropipet, tip pipet, sentrifus, rak <i>ependorf</i> , <i>gloves</i>
Gel agaros	Elektroforesis horizontal, sisir, <i>power supply</i> , <i>microwave</i> , <i>UV transiluminator</i> , mikropipet, tip pipet, alat timbang.
Gel poliakrilamid	Elektroforesis vertikal, <i>power supply</i> , sisir, <i>stirrer</i> , mikropipet, tip pipet, termometer, alat timbang
Pewarna Perak	<i>Shaker</i> , baki plastik, gelas ukur, <i>gloves</i> , alat timbang.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total alel dari enam lokus mikrosatelit 40 kultivar pisang bergenom B sebanyak 48 alel dengan rata-rata delapan alel per lokus (Tabel 5). Lokus MaCIR108 menghasilkan jumlah alel tertinggi, yaitu 13 alel. Jumlah alel lokus ini lebih sedikit dari penelitian Retnoningsih *et al.* (2005) yang menggunakan berbagai tingkat ploidi dan komposisi genom, yaitu 18 alel. Hal ini karena jumlah kultivar yang dianalisis dalam penelitian ini relatif sedikit. Menurut Cerenak *et al.* (2004) jumlah alel yang terungkap bergantung pada jumlah kultivar yang dianalisis.

Setiap pita yang muncul pada gel poliakrilamid merupakan satu alel pada setiap lokus mikrosatelit. Individu triploid maksimal akan menghasilkan tiga pita pada setiap lokusnya. Oleh karena itu dalam penelitian ini untuk setiap lokus hanya ditemukan maksimal tiga alel sesuai dengan tingkat ploidi tertinggi dari kultivar yang dianalisis. Adanya dua pita berarti terdapat dua alel yang berukuran sama dari dua kromosom homolog, sehingga satu alel yang lain berasal dari kromosom ketiga dengan ukuran yang berbeda.

Berdasarkan jumlah alel pada lokus MaCIR108 dapat dilihat variasi pada pisang lebih banyak ditentukan oleh genom A. Variasi tersebut

mungkin berkaitan dengan variasi ukuran genom pisang. Analisis sitogenetika dan sitometri menunjukkan bahwa secara signifikan terdapat variasi ukuran genom A pada *subspecies M.*

acuminata, sedangkan pada *subspecies M. balbisiana* tidak dijumpai variasi ukuran genom B (Dolezel *et al.* 2004). **Baris ini tidak ke bawah?**

Tabel 5. Rata-rata alel per lokus dari 40 kultivar pisang bergenom B pada enam lokus mikrosatelit

Lokus	Ukuran relatif (bp)	Jumlah alel	Alel
MaCIR327b	388-436	5	a ₁ ,a ₂ ,a ₃ ,a ₄ ,a ₅
MaCIR108	220-295	13	b ₁ ,b ₂ ,b ₃ ,b ₄ ,b ₅ ,b ₆ ,b ₇ ,b ₈ ,b ₉ ,b ₁₀ ,b ₁₁ ,b ₁₂ ,b ₁₃
Ma-3-139	130-180	9	c ₁ ,c ₂ ,c ₃ ,c ₄ ,c ₅ ,c ₆ ,c ₇ ,c ₈ ,c ₉
Ma-3-90	132-178	9	d ₁ ,d ₂ ,d ₃ ,d ₄ ,d ₅ ,d ₆ ,d ₇ ,d ₈ ,d ₉
Ma-1-17	110-154	9	e ₁ ,e ₂ ,e ₃ ,e ₄ ,e ₅ ,e ₆ ,e ₇ ,e ₈ ,e ₉
Ma-1-27	122-142	3	f ₁ ,f ₂ ,f ₃
Rata-rata alel per lokus		8	

Dari hasil pengamatan alel setiap kultivar pada setiap lokus, diduga tiga lokus mikrosatelit dapat digunakan sebagai penciri grup genom pisang. Alel b₁, b₂, b₃, dan b₄ pada lokus MaCIR108, alel e₅ pada lokus Ma-1-17, dan alel d₄ pada lokus Ma-3-90 mengarah sebagai penciri pisang bergenom B.

Flanking region lokus MaCIR108 pada *M. acuminata* berukuran 210 bp dan *M. balbisiana* berukuran 259 bp (lebih panjang 49 bp dari *M. acuminata*) sehingga alel-alel lokus tersebut dapat digunakan sebagai karakter pembeda grup genom pisang (Kaemmer *et al.* 1997). Alel khas genom B pada lokus MaCIR108 berukuran 270 – 295 bp, sedangkan alel khas genom A berukuran < 245 bp. Ukuran alel pada genom A dan B dihitung dengan menambahkan sekuen mikrosatelit pada masing-masing *flanking region*.

Pada lokus MaCIR108 terdapat sembilan alel spesifik genom A (b₅, b₆, b₇, b₈, b₉, b₁₀, b₁₁, b₁₂, b₁₃) dan empat alel spesifik genom B (b₁, b₂, b₃, b₄). Genom ABB ditentukan oleh munculnya alel b₁, b₁ dan b₂, atau b₁ dan b₃ dengan unsur alel spesifik genom A, sedangkan genom AAB ditentukan oleh keberadaan alel b₄ dengan unsur alel spesifik genom A. Munculnya alel b₃ saja dengan unsur alel spesifik genom A akan menimbulkan keraguan apakah kultivar tersebut bergenom AAB atau ABB tersebut. Lokus Ma-1-17 dan lokus Ma-3-90 diduga dapat digunakan untuk membedakan genom AAB dan ABB. Apabila terdapat alel e₅ pada lokus Ma-1-17 dan alel d₄ pada lokus Ma-3-90, kultivar tersebut diduga bergenom ABB, sebaliknya apabila tidak

ditemukan alel-alel tersebut diduga bergenom AAB.

Lokus Ma-1-17 tidak selalu dapat mengidentifikasi komposisi genom pisang. Berdasarkan lokus MaCIR108 dan Ma-3-90, kultivar Longong dan Raja Santen bergenom AAB, sedangkan pada lokus Ma-1-17 kultivar tersebut bergenom ABB karena mempunyai alel e₅. Dalam hal ini lokus MaCIR108 dipandang lebih akurat dalam mengidentifikasi komposisi genom pisang (Kaemmer *et al.* 1997) sehingga kedua kultivar tersebut digolongkan ke dalam genom AAB. Lokus Ma-1-17 yang diduga sebagai penciri komposisi genom pisang perlu diteliti lebih lanjut menggunakan jumlah kultivar yang lebih banyak. Selain lokus MaCIR108 dan Ma-3-90, peneliti lain juga menemukan lokus penciri grup genom pisang, yaitu lokus MaOCEN03. Alel spesifik genom A pada lokus MaOCEN03 berukuran >200 bp sedangkan alel spesifik genom B berukuran 180 – 190 bp (Creste *et al.* 2005).

Hasil identifikasi genom antara penanda morfologi dengan mikrosatelit menunjukkan perbedaan. Berdasarkan penanda morfologi, kultivar Sri Wulan bergenom ABB (Pudjoarinto *et al.* 1994) tetapi berdasarkan lokus MaCIR108, Ma-1-17, dan Ma-3-90 kultivar tersebut bergenom AAB. Analisis mikrosatelit lokus MaCIR108 pada kultivar Ketip Gunung Sari menghasilkan dua alel yang mencirikan genom A (b₁₀ dan b₁₃) tanpa alel spesifik genom B sehingga kultivar tersebut tidak termasuk pisang bergenom B. Kultivar Byar termasuk genom ABB (Pudjoarinto *et al.* 1994),

tetapi berdasarkan lokus MaCIR108, Ma-1-17, dan Ma-3-90 kultivar tersebut bergenom AAB.

Hasil identifikasi genom pisang dalam penelitian ini berdasarkan lokus MaCIR108, lokus Ma-1-17, dan lokus Ma-3-90 disajikan dalam Tabel 6. Untuk menentukan tingkat ploidi yang lebih akurat dapat dilakukan dengan analisis sitometri. Analisis ini cukup sensitif membedakan tingkat ploidi tetapi kurang sensitif membedakan

komposisi genom poliploid (Dolezel *et al.* 2004). Analisis mikrosatelit dalam penelitian ini menghasilkan penciri pisang grup genom A dan B. Oleh karena itu perlu dipertimbangkan analisis kombinasi sitometri dan mikrosatelit sebagai acuan mengevaluasi genom pisang. Genom pisang juga dapat ditentukan melalui analisis sitogenetika (Dolezel *et al.* 2004), tetapi teknik ini kurang **baris ini tidak ke bawah?**

Tabel 6. Grup genom 40 kultivar pisang bergenom B berdasarkan lokus MaCIR108, Ma-1-17, dan Ma-3-90

No.	Kultivar	Grup genom	No.	Kultivar	Grup genom
1.	Raja Nangka	AAB	21.	Sobo Londoijo	ABB
2.	Longong	AAB	22.	Raja Bagus	AAB
3.	Raja Lini	AAB	23.	Kepok Lumut	ABB
4.	Sri Wulan	AAB	24.	Batu	BB
5.	Raja Pendopo	ABB	25.	Kepok Awu	ABB
6.	Raja Entog	ABB	26.	Raja Bandung	ABB
7.	Ketip Gn. Sari	AA/AAA	27.	Siam Paris	ABB
8.	Kepok Asam	ABB	28.	Gablok	ABB
9.	Raja Bali	ABB	29.	Susu	AAB
10.	Sobo Kerik	ABB	30.	Kepok Amerika	AAB
11.	Gedah	ABB	31.	Raja Sableng	AAB
12.	Pulut	AAB	32.	Kepok Ladrang	ABB
13.	Kepok Gandul	ABB	33.	Kepok Urang	ABB
14.	Koja Santen	AAB	34.	Raja Santen	AAB
15.	Abu Awak	ABB	35.	Austroli	AAB
16.	Wangu	ABB	36.	Raja Kasman	AAB
17.	Raja Sereh	AAB	37.	Kepok Byar	ABB
18.	Sobo Kapuk	ABB	38.	Byar	AAB
19.	Kepok Brot	ABB	39.	Kaso	ABB
20.	Bangkahulu	AAB	40.	Gandul	ABB

diminati karena prosedur analisis yang rumit, jumlah kromosom pisang cukup banyak ($x=11$), dan ukuran genom pisang relatif kecil (534 – 615 Mb) (Dolezel *et al.* 2004).

Mikrosatelit bersifat kodominan sehingga genotipe dapat langsung ditentukan berdasarkan variasi alel (Crouch *et al.* 1998). Kombinasi alel tersebut merupakan genotipe untuk setiap lokus. Genotipe yang terdeteksi seluruhnya ada 75. Lokus MaCIR327b mendeteksi delapan genotipe dengan dua genotipe spesifik tanpa alel spesifik. Lokus MaCIR108 mendeteksi 20 genotipe dengan

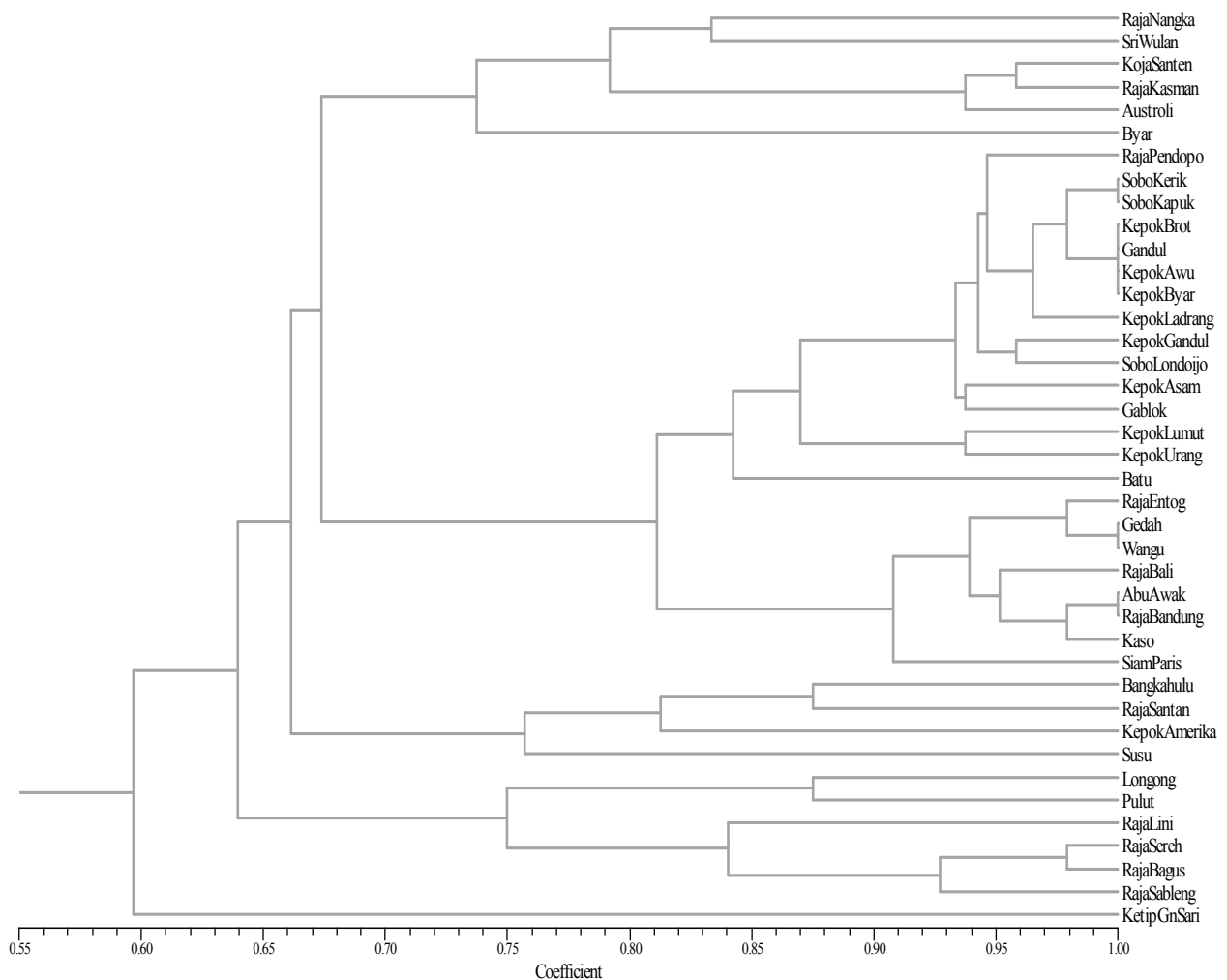
15 genotipe spesifik dan satu alel spesifik, yaitu alel b_{10} yang dimiliki kultivar Ketip Gunung Sari. Lokus Ma-3-139 mendeteksi 13 genotipe dengan delapan alel spesifik dan satu alel spesifik, yaitu alel C_{18} yang dimiliki kultivar Raja Nangka. Lokus Ma-3-90 mendeteksi 14 genotipe dengan enam genotipe spesifik dan dua alel spesifik, yaitu alel d_6 dan d_9 yang dimiliki kultivar Ketip Gunung Sari dan Austroli. Lokus Ma-1-17 mendeteksi 15 genotipe dengan sembilan genotipe spesifik dan satu alel spesifik, yaitu alel e_2 . Lokus Ma-1-27

mendeteksi lima genotipe dengan satu genotipe spesifik tanpa alel spesifik.

Adanya alel-alel spesifik menimbulkan dugaan bahwa kultivar tersebut mempunyai sifat fenotip khas, karena penanda molekuler sering berada di dekat gen (Muladno 2002). Dugaan tersebut perlu diperkuat dengan penelitian lebih lanjut melalui analisis kombinasi mikrosatelit, morfologi, dan sifat-sifat agronomi. Tidak adanya alel spesifik pada lokus MaCIR327b, lokus Ma-1-17, dan lokus Ma-1-27 mungkin karena lokus tersebut kurang polimorfik atau terbatasnya jumlah kultivar yang dianalisis. Untuk mendapatkan polimorfisme yang lebih tinggi dan alel-alel spesifik tertentu diperlukan analisis

dengan jumlah lokus dan jumlah kultivar yang lebih banyak (Cerenak *et al.* 2004).

Pada populasi poliploid alami, alel mikrosatelit simplek, duplek maupun triplek, tidak dapat ditentukan (Zhang *et al.* 2000). Oleh karena itu, nilai heterozigositas harapan (H_e) untuk individu pisang poliploidi tidak dapat diketahui. Individu pisang triploid yang memperlihatkan dua pita, tidak dapat diketahui alel mana yang tunggal dan mana yang ganda sehingga dalam penelitian ini nilai heterozigositas harapan tidak dihitung. Pada kasus seperti ini, tingkat keanekaragaman genetica diduga melalui perhitungan nilai heterozigositas pengamatan (H_o).



Gambar 1. Dendrogram 40 kultivar pisang bergenom B berdasarkan 48 alel mikrosatelit

Nilai H_o dihitung berdasar rasio antara jumlah individu heterozigot dan jumlah seluruh kultivar yang dianalisis. Rata-rata nilai heterozigositas pengamatan (H_o) dari enam pasang primer yang digunakan adalah 0,77 (berkisar antara 0,35 sampai 0,97). Hal ini menunjukkan dari 40 kultivar pisang bergenom B yang bergenotipe heterozigot untuk enam lokus mikrosatelit sebanyak 77%. Angka ini menunjukkan nilai H_o yang cukup tinggi sebagai dasar untuk keperluan pemuliaan tanaman pisang (Cerenak *et al.* 2004). Pengelompokan 40 kultivar pisang bergenom B berdasarkan enam lokus mikrosatelit menghasilkan dendrogram dengan nilai koefisien kemiripan antara 0,597 – 1,00 (Gambar 7). Semakin besar nilai koefisien kemiripan, maka semakin dekat hubungan kekerabatan antar kultivar.

Tingkat keanekaragaman ditentukan oleh besar kecilnya nilai koefisien kemiripan. Beberapa kelompok kultivar mempunyai nilai koefisien kemiripan satu atau memiliki kesamaan 100%.

Kultivar Sobo Kerik sinonim dengan Sobo Kapuk. Kultivar Kepok Brot sinonim dengan Gandul, Kepok Awu, dan Kepok Byar. Kultivar Gedah sinonim dengan Wangu. Kultivar Abu Awak sinonim dengan Raja Bandung. Secara umum pengelompokan kultivar pada penelitian ini sesuai dengan penelitian berdasarkan penanda morfologi (Jumari 2000; Jumari & Pudjoarinto 2000). Kultivar Abu Awak dan Raja Bandung serta kultivar Gedah dan Wangu termasuk subgrup Awak. Kultivar Kepok Brot, Gandul, Kepok Awu, dan Kepok Byar termasuk subgrup Kepok. Kultivar Sobo Kerik dan Sobo Kapuk termasuk dalam subgrup Sobo.

Berdasarkan penanda morfologi (Jumari dan Pudjoarinto 2000), subgrup Awak termasuk pisang meja, ukuran buah sedang, bentuk buah membulat, dan kulit buah tipis.

Subgrup Kepok termasuk buah olahan, ukuran buah sedang, penampang melintang buah sangat bersegi, kulit buah tebal, dan daging buah berwarna kuning apabila telah masak. Subgrup Sobo termasuk buah olahan, ukuran buah sedang-panjang, penampang melintang buah sangat bersegi, kulit buah tebal, dan daging buah berwarna putih-krem dan sangat lunak apabila telah masak. Mikrosatelit tersebar banyak pada genom tanaman sehingga diperlukan analisis

lanjut menggunakan jumlah lokus mikrosatelit yang lebih banyak guna meningkatkan ketelitian pengamatan hubungan kekerabatan antar kultivar pisang.

Pada nilai koefisien 0,70 terbagi menjadi 5 kelompok. Kelompok I beranggotakan genom AAB, kelompok II beranggotakan genom ABB, kelompok III dan IV beranggotakan genom AAB, dan kelompok V hanya beranggotakan kultivar Ketip Gunung Sari. Terpisahnya genom AAB pada kelompok I, III, dan IV karena variasi ukuran genom pada pisang lebih banyak ditentukan oleh genom A. Kelompok kultivar bergenom ABB cenderung tidak terpisah karena tidak dijumpai variasi ukuran genom B (Dolezel *et al.* 2004). Kultivar Ketip Gunung Sari terpisah dari kultivar lainnya dan memiliki kekerabatan paling jauh dengan nilai koefisien 0,597 karena tidak termasuk pisang bergenom B.

PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diambil simpulan bahwa total alel yang terdeteksi sebanyak 48 alel dengan rata-rata delapan alel per lokus. Jumlah alel tertinggi ditemukan pada lokus MaCIR108 sebanyak 13 alel.

Genotipe yang terdeteksi seluruhnya ada 75. Pada lokus MaCIR327 mendeteksi delapan genotipe (dua genotipe spesifik tanpa alel spesifik). Lokus MaCIR108 mendeteksi 20 genotipe (15 genotipe spesifik dan satu alel spesifik). Lokus Ma-3-139 mendeteksi 13 genotipe (delapan alel spesifik dan satu alel spesifik). Lokus Ma-3-90 mendeteksi 14 alel spesifik (enam genotipe spesifik dan dua alel spesifik). Lokus Ma-1-17 mendeteksi 15 genotipe (sembilan genotipe spesifik dan satu alel spesifik). Lokus Ma-1-27 mendeteksi lima genotipe (satu genotipe spesifik tanpa alel spesifik).

Rata-rata nilai heterozigositas pengamatan (H_o) pada enam pasang primer adalah 0,77. Nilai H_o tersebut cukup tinggi sebagai dasar untuk keperluan pemuliaan tanaman pisang. H_o tertinggi pada lokus MaCIR108 (0,97).

Nilai koefisien kemiripan pada 40 kultivar pisang bergenom B berkisar antara 0,597 – 1,00. Semakin tinggi nilai koefisien kemiripan, maka semakin dekat hubungan kekerabatan antar kultivar.

Lokus MaCIR108 dan lokus Ma-3-90 dapat digunakan sebagai karakter pembeda grup genom pisang. Lokus Ma-1-17 masih diduga keakuratannya dalam menentukan komposisi genom pisang.

Terdapat perbedaan hasil identifikasi genom antara penanda morfologi dan mikrosatelit. Berdasarkan penanda morfologi, kultivar Sri Wulan dan Byar bergenom ABB, dan Ketip Gunung Sari bergenom AAB, tetapi berdasarkan mikrosatelit kultivar Sri Wulan dan Byar bergenom AAB, sedangkan Ketip Gunung Sari tidak termasuk pisang bergenom B.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada Diperta Yogyakarta dan PKBT IPB. Penelitian ini dibiayai oleh proyek Riset Unggulan Nasional (Rusnas) melalui PKBT IPB tahun anggaran 2004/2005.

DAFTAR PUSTAKA

- Azrai M. 2005. Pemanfaatan marka molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. *Jurnal Agrobiogen* (1).
- Cerenak A, Jakse J, & Branka J. 2004. Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers. *American Society of Brewing Chemists* (1): 1-7.
- Creste S., Benatti TR, Orsi MR, Ange-Marie Risterucci, & Figueira A. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. *Molecular Ecology Notes* 2005.
- Crouch HK, Crouch JH, Jarret RL, Cregan PB, dan Ortiz R. 1998. Segregation at microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. *Crop Science* (38): 211-217.
- Crouch JH, Crouch HK, Constandt H, Van Gysel A, Breyne P, Montagu MV, Jarret RL, & Ortiz R. 1999. Comparison of PCR-based molecular marker analyses of *Musa* breeding populations. *Molecular Breeding* (5): 233-244.
- Dolezel J, Valarik M, Vrana J, Lysak MA, Hoibova E, Bartos J, Gasmanova N, Dolezelova M, Safao J, & Simkova H. 2004. Molecular cytogenetics and cytometry of bananas (*Musa* spp.). Di dalam Jain SM & Swennen R, ed. *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations*. Plymouth USA: Science Publisher.
- International Maize and Wheat Improvement Center. 2004. Laboratory Handbook. *Protocols for Maize Genotyping Using SSR Marker and Data Analysis*. Philipines: AMBONET
- [INIBAP] International Network for the Improvement of Banana and Plantain. 2003. Banana Diversity. <http://www.inibap.org>. [12 Juli 2003]
- Jumari & Pudjoarinto A. 2000. Kekerabatan fenetik kultivar pisang di Jawa. *Biologi* (9): 531-542.
- Jumari. 2000. Taksonomi numerik kultivar pisang genus *musa* koleksi kebun plasma nutfah pisang Kotamadya Yogyakarta. *Tesis*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Kaemmer D, Fischer D, Jarret RL, Baurens FC, Grapin A, Dambier D, Noyer JL, Lanaud C, Kahl G, & Lagoda P. 1997. Molecular breeding in the genus *Musa*: a strong case for STMS marker technology. *Euphytica* (96): 49-63.
- Megia R, Caecelia Y, Sulistyaningsih N, & Djuita. 2001. Isozyme polymorphisms for cultivar identification in Indonesia bananas. *Hayati* (8): 81-85.
- Muladno. 2002. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- Nasution RE & Yamada I. 2001. *Pisang-pisang Liar di Indonesia*. Bogor: Puslitbang Biologi-LIPI.
- Pillay M, Ogundiwin E, Tenkuano A, & Dolezel J. 2006. Ploidy and genome composition of *musa* germplasm at The International Institute of Tropical Agriculture (IITA). *African Journal of Biotechnology* (13): 1224-1232.

- Pudjoarinto A, Purnomo H, Sujatmiko R, Susandari, & Kasiamdari R. 1994. *Penelitian Sistem Informasi Plasma Nutfah Pisang Kotamadya Daerah Tingkat II Yogyakarta*. Kerjasama Dinas Pertanian Kodya Yogyakarta Fak. Biologi UGM.
- PROMUSA. 2002. Regional Initiative to Improve *Musa* in Asia. *Workshop on Musa balbisiana Diversity* 8-10 July 2002, Bangkok, Thailand.
- Rao NK. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* (2): 136-145.
- Siddiqah M. 2002. Biodiversitas & hubungan kekerabatan berdasarkan karakter morfologi berbagai plasma nutfah pisang. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Simmonds NW. 1962. *The Evolution of the Bananas*. London: Longman Inc.
- _____. 1995. Bananas *Musa* (*Musaceae*) di dalam: Smarti, J., Simmonds, NW(eds) *Evol of Crop Plants* 2nd ed. England: Longman Science and Technology.
- Sneath PHA & Sokal RR. 1973. *Numerical Taxonomy*. San Fransisco: Freeman.
- Stover RH & Simmonds NW. 1987. *Banana*, 3rd Edition. UK: Longmans Scientific and Technical
- Retnoningsih A, Megia R, Rifai MA, & Hartana A. 2005. Keanekaragaman genetika pisang berdasarkan SSR (*Simple Sequence Repeat*). Makalah *Seminar Nasional PTTI* tgl 17-19 Nopember 2005.
- Rohlf FJ. 1998. *NTYSpC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.02. User Guide*. New York: Exeter Software Applied Biostatistics Inc.
- Valmayor RV, Jamaluddin SH, Silayoi B, Kusumo S, Danh LD, Pascua OC, & Espino RRC. 2000. *Banana Cultivar Names and Synonyms in Southeast Asia*. Los Banos: INIBAP.
- Zhang DP, Carbajulca D, Ojeda L, Rossel G, Milla S, Herrera C, & Ghislain M. 2000. Microsatellite analysis of genetic diversity in sweetpotato varieties from Latin America. *CIP Program Report* 1999-2000.