

Induksi dan Karakterisasi Pisang Mas Lumut Tetraploid (Induction and characterization of tetraploid Pisang Mas Lumut)

Yuyu S. Poerba, Witjaksono, F. Ahmad & T. Handayani

Pusat Penelitian Biologi LIPI, Jl Raya Jakarta-Bogor Km 46 Cibinong, Email: yuyupoerba@gmail.com

Memasukkan: Desember 2013, Diterima Mei 2014

ABSTRACT

Triploid banana breeding could be achieved by crossing tetraploid to diploid banana cultivars. The availability of tetraploid bananas is naturally very limited. One of methods to produce tetraploid bananas is inducing tetraploid plants using chemicals that inhibit spindle fiber formation during mitosis such as oryzalin or colchicine. The present research is aimed to produce and characterize tetraploid Pisang Mas Lumut (*Musa acuminata*, AAAA genome) induced by *in-vitro* oryzalin treatment from diploid Pisang Mas Lumut. Fifteen *in vitro*-cultured shoots were treated with oryzalin at of 60 μ M for 7 days in a liquid MS basal medium with addition of 2 mg/l BA. After 6 sub-cultured, 54 shoots and 104 plantlets were produced. Forty seedlings were then survived and grew well and healthy. Ploidy identification of induced Pisang Mas Lumut was conducted using Flowcytometer at seedling stage and repeated at reproductive phases for 2 cycles. The results showed that oryzalin treatments produced tetraploids at a frequency of 30%, diploid at 65% and mixoploid at 5%. The tetraploid plants have longer and thicker pseudostems, produce fewer suckers, drooping and larger leaves, and broader fruits compared to its diploid control at harvest time. The tetraploid plants have similar genetic properties with their diploid controls as shown by genetic identity of 0.90-0.97.

Key words: Pisang Mas Lumut, *Musa acuminata*, AA, oryzalin, tetraploid

ABSTRAK

Pemuliaan pisang triploid dapat dicapai dengan persilangan kultivar pisang tetraploid dengan pisang diploid. Ketersediaan pisang tetraploid di alam sangat terbatas. Salah satu metode untuk menghasilkan pisang tetraploid adalah dengan menginduksi tanaman tetraploid dengan menggunakan bahan kimia yang menghambat terbentuknya *spindle fiber* selama mitosis seperti oryzalin atau kolkisin. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan dan melakukan karakterisasi Pisang Mas Lumut tetraploid (*Musa acuminata*, genom AAAA) yang diinduksi secara *in-vitro* dari Pisang Mas diploid dengan perlakuan oryzalin. Limabelas kultur tunas *in-vitro* diperlakukan dengan 60 μ M oryzalin selama 7 hari dalam media basal MS cair dengan penambahan 2 mg/l BA. Setelah 6 sub-kultur, dihasilkan 54 tunas dan 104 plantlet. Hanya empat puluh bibit yang kemudian tumbuh baik dan sehat. Identifikasi ploidi Pisang Mas Lumut tetraploid hasil induksi dilakukan dengan Flowcytometer pada tahap bibit dan diulang pada tahap reproduktif selama dua siklus tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan oryzalin menghasilkan 30% tetraploid, 65% diploid dan 5% mixoploid. Tanaman tetraploid memiliki batang semu yang lebih panjang dan tebal, anakan lebih sedikit, daun yang merunduk dan lebih besar serta buah yang lebih gemuk dibandingkan control diploidnya pada saat panen. Tanaman tetraploid memiliki properti genetik yang sama dengan tanaman diploid kontrol yang terlihat pada nilai identitas genetik 0.90-0.97.

Kata Kunci: Pisang Mas Lumut, *Musa acuminata*, AA, oryzalin, tetraploid

PENDAHULUAN

Pisang (*Musa* spp.) merupakan tanaman buah penting di Indonesia dan dunia. Tanaman pisang di Indonesia tersebar hampir di segala tempat yang

menunjukkan mudahnya tanaman ini tumbuh. Indonesia dan kawasan Asia Tenggara termasuk pusat persebaran tanaman pisang komersial. Lebih dari dua ratus varietas ditanam petani yang seluruhnya adalah varietas alami yang belum

mengalami perbaikan/pemuliaan. Hingga saat ini belum ada varietas hasil pemuliaan pisang yang sudah dilepas (Pusat Perlindungan Varietas dan Perizinan Pertanian, <http://ppvt.setjen.deptan.go.id/ppvtp/files/vhp-2013.pdf>).

Tidak banyak tersedianya varietas/klon hasil pemuliaan konvensional disebabkan karena kompleksnya sistem genetik pada tanaman pisang. Pisang komersial pada umumnya triploid [misalnya Pisang Ambon (AAA), Pisang Barangan (AAA), Pisang Ambon Lumut (AAA), Pisang Tanduk (AAB), Pisang Raja (AAB), Pisang Raja Sere (AAB), Pisang Kepok (ABB)] dan sebagian diploid [Pisang Mas (AA), Pisang Uli (AA)], dan hanya beberapa merupakan tetraploid alami, misalnya Pisang Ustrali (AAAB). Pisang komersial terdiri dari lebih dari satu genom, serbuk sari steril, kegagalan dalam sistem penyerbukan/pembuahan, heterozigositas yang tinggi, partenokarpi (karpel tumbuh walaupun embrio tidak berkembang sehingga buah terbentuk tetapi tanpa biji) (Simmonds & Shepherd 1955).

Salah satu strategi yang dianut untuk pemuliaan pisang triploid adalah persilangan pisang tetraploid dengan diploid dan/atau resiproknya untuk menghasilkan pisang triploid (Stover & Simmonds, 1987; Uma *et al.* 2004; Bakry *et al.* 2007, 2009, Oselebe *et al.* 2010; Kanchanapoom & Koarapachaikul 2012). Karena itu penggandaan kromosom pisang diploid yang mempunyai sifat yang diinginkan sehingga menjadi pisang tetraploid untuk tetua persilangan merupakan salah satu prasyarat utama untuk pemuliaan pisang triploid. Pusat Penelitian Biologi LIPI telah menghasilkan Pisang Madu tetraploid dan telah berhasil disilangkan dengan pisang liar diploid, *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (Ridl.) Nasution dan menghasilkan hibrid MDMM triploid (Poerba *et al.* 2010).

Pisang Mas merupakan salah satu kultivar pisang diploid (kelompok genom AA) yang banyak dibudidayakan di Indonesia (Poerba & Ahmad 2010; Sumardi & Wulandari 2010; Valmayor *et al.* 2000). Pisang diploid (kelompok genom AA) terdiri atas berbagai kultivar pisang yang memiliki dua set kromosom yang diturunkan dari sub-species/varietas *Musa acuminata*. Kelompok pisang ini bersifat

partenokarpi dan tidak berbiji. Kelompok pisang ini termasuk buah pisang diploid yang dapat dimakan (*edible diploid*), yang berbeda dengan kelompok pisang liar yang juga diploid dan berbiji (Simmonds & Shepherd, 1955). Pisang Mas memiliki bentuk kecil dengan aroma harum dan rasa yang lebih manis. Pisang Mas memiliki banyak varian dan diantaranya adalah Mas Jambe, Mas Besar, Mas Penjalin, Mas Beranjut, Mas 40 hari, Mas Kirana, Mas Rejang, Mas Jalil, Mas Raja dan Mas Lumut (Poerba & Ahmad 2010, Retnoningsih *et al.* 2009; Sumardi & Wulandari 2010). Keistimewaan Pisang Mas Lumut ini memiliki rasa yang enak, manis dan aroma harum. Pembentukan autotetraploidi Pisang Mas Lumut berguna sebagai tetua dalam persilangan 4x x 2x untuk mendapatkan pisang triploid dengan keunggulan tertentu, terutama rasa manis dan enak (dari Mas Lumut) dan karakter lain dari tetua diploid (misalnya ketahanan terhadap penyakit layu Fusarium).

Induksi autotetraploidi pada pisang telah banyak dilakukan dengan menggunakan senyawa penghambat pembentuk *spindle*, seperti colchicine (Vakili 1967; Hamill *et al.* 1992, Asif *et al.* 2000; Rodrigues *et al.* 2011) dan oryzalin (van Duren *et al.* 1996; Ganga & Chezhiyan 2002; Kanchanapoom & Koarapachaikul 2012) baik pada biji/kecambah (Vakili 1967), kalus (Kanchanapoom & Koarapachaikul 2012), maupun pada kultur tunas *in-vitro* (Hamill *et al.* 1992; van Duren *et al.* 1996). Oryzalin lebih sering dipergunakan untuk induksi poliploid karena mempunyai efektivitas sama dengan colchicine (Roux *et al.* 1994; van Duren *et al.* 1996; Ganga & Chezhiyan 2002; Bakry *et al.* 2007, 2009; Kanchanapoom & Koarapachaikul 2012) bahkan pada konsentrasi yang lebih rendah daripada colchicine, sehingga efek *cytotoxic* dapat diminimalkan (Dhooghe *et al.* 2009). Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan dan karakterisasi Pisang Mas Lumut tetraploid yang diinduksi dengan menggunakan oryzalin.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan yang digunakan adalah Pisang Mas Lumut diploid (AA) yang diperoleh dari Kebun

Plasma Nutfah Pisang milik Dinas Pertanian Kota Yogyakarta di Malangan, Giwangan, Umbulharjo, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Sel dan Jaringan Tumbuhan, Laboratorium Genetika Tumbuhan dan Kebun Percobaan Cibinong, Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong.

Induksi tetraploid dilakukan terhadap tunas pisang Mas Lumut diploid dari biak tunas *in vitro* dengan menggunakan oryzalin sesuai dengan protokol Van Duren *et al.* (1996). Sebanyak 15 biak tunas Pisang Mas Lumut diploid direndam dan dikocok (ditempatkan dalam *shaker*) selama 7 hari dalam larutan basal medium MS (Murashige & Skoog 1962) dengan penambahan BA sebanyak 2 mg/l dan 60 μ M oryzalin. Tunas tersebut kemudian ditanam pada medium MS yang mengandung 30 g/l gula, 100 mg/l myo inositol, 4 mg/l, thiamine HCl dan 2 mg/l BA dan dipadatkan dengan 8 g/l agar. Medium diatur pada pH 5.7-5.8 Kultur tunas disubkultur sebanyak 4-5 kali untuk memisahkan khimera. Subkultur dilakukan setiap 4 minggu. Pada subkultur yang pertama biak tunas diberi kode S1, pada subkultur kedua diberi kode S2, dan seterusnya. Subkultur dilakukan hingga S6. Biak tunas dipelihara pada ruang dengan suhu 25°C dengan intensitas penyorotan dari 2 lampu TL, 60 Watt.

Seleksi awal tetraploidi dilakukan pada setiap tahap subkultur, dengan tanaman yang vigor sebagai kriteria seleksi. Aklimatisasi dilakukan dalam dua tahap. Pada tahap pertama, tunas di tanam dalam bak plastik yang diisi medium tumbuh pasir, tanah dan *cocopeat* steril dan dengan perbandingan 2:1:2 ditutup rapat dengan plastik dan dipelihara di bawah naungan 50-75%. Tahap kedua, setelah 1 bulan dan daun baru tumbuh dan akar telah beregenerasi, bibit dipindah pada medium tanah dalam polibag dan dipelihara dengan naungan 25-50% selama 2-3 bulan dan selanjutnya naungan dibuka sepenuhnya selama sebulan sebelum bibit dapat di tanam di lapang. Seleksi juga dilakukan pada tahap pembibitan, dengan kriteria seleksi yaitu ukuran stomata yang lebih besar dan habitus tanaman yang merunduk.

Identifikasi tingkat ploidi dilakukan pada tahap pembibitan dan diulang pada tahap reproduksi selama dua siklus tanaman. Identifikasi tingkat ploidi dilakukan dengan menggunakan Flow-cytometer mengacu pada protokol untuk pisang (Doležel *et al.* 2004). Potongan daun berukuran 0,5 cm² diletakkan pada cawan petri dan ditetesi 1,5 ml *buffer cystain* UV-Ploidi (Partec, Germany) dan dicacah dengan silet. Cacahan daun disaring dengan saringan 30 m dan filtrat dimasukkan dalam tabung *cuvette* untuk analisa. Sampel dibaca pada panjang gelombang 440 nm dan kecepatan 1000 *nuclei* per detik. Sampel kontrol tanaman diploid dikalibrasi pada *channel* 200. Tanaman diploid menunjukkan *peak* pada *channel* 200, triploid pada *channel* 300 tetraploid pada *channel* 400, dan tanaman *mixoploid* menunjukkan lebih dari 1 *peak* pada *channel* yang berbeda.

Karakterisasi dilakukan pada masing-masing 10 tanaman tetraploid dan mixoploid hasil induksi dan 10 tanaman diploid (kontrol, tanpa induksi). Parameter yang diamati meliputi 35 sifat kualitatif tanaman dan 16 sifat kuantitatif tanaman, berdasarkan kriteria dari UPOV (2010). Karakterisasi dilakukan selama 2 siklus tanaman, yang dimulai dengan munculnya perbungaan (8 bulan setelah tanam) hingga pasca panen (10-11 bulan setelah tanam).

Pisang Mas Lumut LIPI hasil induksi poliploidi diidentifikasi secara molekuler dengan menggunakan marka Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan metoda CTAB (Delaporta *et al.* 1983) yang dimodifikasi. Analisis ISSR dilakukan terhadap 52 sampel Pisang Mas Lumut hasil induksi poliploidi dan 4 sampel Pisang Klutuk (sebagai pembanding) dengan menggunakan 10 primer terpilih, yaitu UBC-811, UBC-814, UBC-815, UBC-822, UBC-823, UBC-826, UBC-834, UBC-835, UBC-843 dan UBC-844 (University of British Columbia). Reaksi PCR dilakukan pada volume total 15 ml yang berisi 0.2 nM dNTPs; 1X bufer reaksi; 2mM MgCl₂; 25 ng DNA sample; 1 pmole primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) dengan meng-

gunakan Thermocycler (Takara) selama 35 siklus. Amplifikasi DNA dilakukan dengan kondisi amplifikasi dari protokol Witono *et al.* (2008) sebagai berikut: pemanasan sebelum PCR pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 35 siklus yang terdiri atas denaturasi 1 menit pada suhu 94°C, annealing 1 menit pada suhu 50°C, dan 5 menit ekstensi pada suhu 72°C. Setelah 35 siklus selesai, pendinginan pada suhu 4°C.

Hasil amplifikasi PCR difraksinasi secara elektroforesis pada gel agarosa 2.0% dalam bufer TAE (Tris-EDTA) dengan menggunakan Mupid Mini Cell selama 50 menit pada 50 Volt. Kemudian direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi akhir 1ml/100 ml selama 10 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA dideteksi dengan menggunakan UV transluminator, kemudian difoto dengan menggunakan geldocomentiation system (Takara). Sebagai standar ukuran DNA digunakan 100 bp plus DNA ladder (Fermentas) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

Setiap pita ISSR dianggap sebagai satu alel putatif. Hanya alel yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk skoring: ada (1) dan kosong (0). Matriks binari fenotip ISSR ini kemudian disusun untuk digunakan pada analisis kluster dengan matrik jarak genetik antar populasi dihitung dengan menggunakan Nei's unbiased genetic distances (Nei 1978) dengan program POPGENE software (Yeh *et al.*, 1999). Dendrogram yang dihasilkan dari analisis dilihat menggunakan program TREEVIEW software (Page 1998).

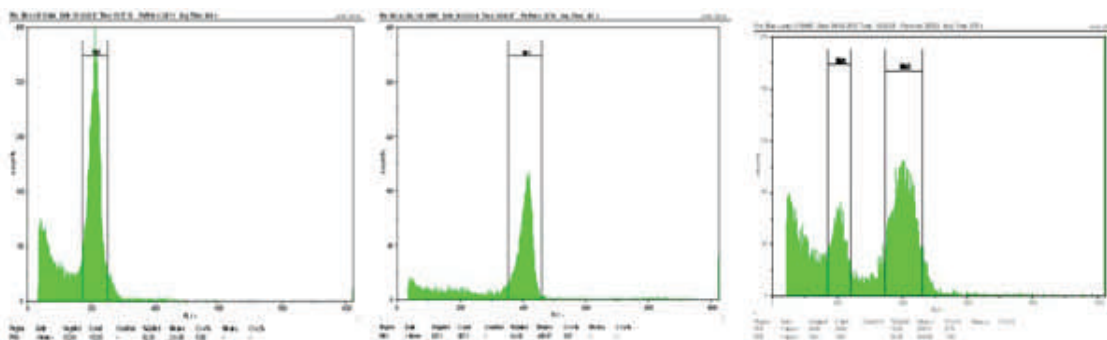
HASIL

Identifikasi tingkat ploidi Pisang Mas Lumut hasil induksi poliploidi

Sebanyak 54 tunas Pisang Mas Lumut dihasilkan pada tahap sub-kultur ke-6 setelah perlakuan dengan oryzalin. Selanjutnya 54 tunas tersebut disubkultur ke media basal tanpa penambahan BA, dan berkembang hingga menjadi 107 tunas. Sebanyak 107 tunas ini kemudian diaklimatisasi, dan selanjutnya ditanam di pembibitan. Setelah diseleksi, hanya 40 bibit hasil perlakuan oryzalin yang tumbuh baik dan sehat di pembibitan. Hasil identifikasi ploidi dengan menggunakan Flowcytometer dari 40 bibit Pisang Mas Lumut tersebut diperoleh 26 (65%) tanaman diploid, 12 (30%) tanaman tetraploid dan 3 (5%) tanaman mixoploid (Tabel 1). Contoh hasil identifikasi ploidi terlihat pada Gambar 1. Gambar 1A adalah contoh hasil pisang diploid, Gambar 1B menunjukkan pisang tetraploid dan Gambar 1C adalah contoh pisang mixoploid.

Penampilan fenotipik Pisang Mas Lumut Tetraploid

Dari pengamatan karakter kualitatif tanaman, hanya ada satu sifat/karakter yaitu pertumbuhan daun/habitus tanaman yang merunduk pada tanaman Pisang Mas Lumut tetraploid dibandingkan habitus tanaman yang tegak pada tanaman Pisang Mas diploid (Tabel 2). karakter kualitatif lainnya pada umumnya tidak berbeda antara Pisang Mas tetraploid dengan Pisang Mas diploid (Tabel 2). Sedangkan



Gambar 1. Contoh hasil identifikasi tingkat ploidi dengan Flowcytometer: Pisang Mas Lumut diploid (A), tetraploid (B) dan Pisang Mas Lumut mixoploid .

Tabel 1. Tingkat ploidi Pisang Mas Lumut (kontrol) dan hasil perlakuan oryzalin.

No	No Akses	Mean	CV (%)	Ploidi
Pisang Mas Lumut (Kontrol)				
1	II 8B#1a	201.05	8.23	2x
2	II 8B#1b	204.49	7.22	2x
3	II 8B#1c	196.09	7.73	2x
4	II 8B#2a	193.77	8.1	2x
5	II 8B#2b	226.24	7.49	2x
6	II 8B#3a	209.59	8.09	2x
7	II 8B#3b	213.09	7.97	2x
8	II 8B#3c	181.8	9.01	2x
9	II 8B#4	177.84	8.71	2x
10	II 8B#5	187.73	8.34	2x
11	III 15B#1	178.52	9.67	2x
12	III 10G#4	165.63	8.08	2x
Pisang Mas Lumut hasil perlakuan oryzalin				
1	I 2B#1	213.97	6.12	2x
2	I 2B#2	189.76	6.11	2x
3	I 2B#3	205.09	5.23	2x
4	I 2B#5	213.14	7.88	2x
5	I 3A#2	185.31	17.75	2x
6	I 3B#5	206.14	6.16	2x
7	I 9A#2a	123.32	16.79	2x
8	I 9A#2b	195.87	8.73	2x
9	I 9A#3	143.73	9.62	2x
10	I 9A#4	179.29	5.94	2x
11	I 9A#5	184.43	9.47	2x
12	III 9C#3	185.43	9.4	2x
13	III 16A#1	226.07	8.53	2x
14	III 16A#2	208.53	8.69	2x
15	III 16A#4	187.62	9.94	2x
16	III 16A#5	180.03	9.77	2x
17	IV 7A#1a	188.69	8.51	2x
18	IV 7A#1b	197.64	7.87	2x
19	IV 7A#4	207.3	7.6	2x
20	VI 19B#2	163.01	6.65	2x
21	VI 21A#1	237.66	7.35	2x
22	VI 21A#2	234.02	6.04	2x
23	VI 21A#3	192	8.21	2x
24	VI 21A#4	187.18	7.92	2x
25	VI 21A#5	178.09	7.75	2x
26	VI 24C#5	193.08	7.07	2x
27	I 2B#4	392.1	4.22	4x
28	I 3A#1	369.62	6.62	4x
29	I 3A#3	421.2	6.95	4x
30	I 3A#4	401.74	7.39	4x
31	I 3B#1	398.72	7.84	4x
32	I 3B#2	416.3	6.67	4x
Pisang Mas Lumut hasil perlakuan Oryzalin				
33	I 3B#3	422.9	7.05	4x
34	I 9A#1	363.69	8.51	4x
35	IV 7A#2a	471.52	6.51	4x
36	IV 7A#3b	471.52	6.51	4x
37	IV 7A#5	462.7	5.92	4x
38	I 2B#4	392.1	4.22	4x
39	I 3B#4	211.83	9.21	mix 2x-4x
		419.84	6.97	
40	III 16A#3	187.18	7.92	mix 2x-4x
		381.4	5.77	

Tabel 2. Penampilan karakter kualitatif Pisang Mas Lumut Tetraploid.

No	Karakter	Pisang Mas Lumut
1	Pelepah daun overlap	Sedang
2	<i>Pseudostem: tapering</i>	Tidak ada
3	Warna batang semu	Ungu
4	Antosianin pada batang semu	Kuat
5	Warna pelepah bagian dalam	Hijau kekuningan
6	Kekompakan mahkota	Sedang
7	Habitus tanaman	Merunduk
8	Bentuk tangkai daun bagian pangkal	Lurus
9	Warna tulang daun bagian bawah	Kuning
10	Bentuk daun bagian pangkal	Kedua sisi runcing
11	Lapisan lilin pada daun bagian bawah	Tidak ada-sedikit
12	Kilap pada daun bagian atas	Ada
13	Bulu pada tangkai tandan	Ada
14	Lekukan tangkai tandan	Kurang
15	Bentuk tandan	Tidak beraturan
16	Susunan buah	Horizontal – agak melengkung ke atas
17	Kekompakan tandan	Sedang
18	Perbungaan jantan	Melengkung dengan ujung vertikal
19	Bekas perbungaan	Sedang
20	Keberadaan braktea	Tidak ada
21	Keberadaan bunga hermaprodit	Tidak ada
22	Lekukan buah	Lurus
23	Punggung kulit buah	Tidak ada
24	Bentuk ujung buah	Rumpang
25	Warna kulit buah sebelum masak	Hijau muda
26	Warna kulit buah	Kuning
27	Kelekatan kulit buah	Sedang
28	Keberadaan organ perbungaan pada buah	Ada
29	Warna daging buah	Kuning
30	Kekerasan buah	Lunak
31	Keberadaan perbungaan jantan/jantung	Ada
32	Bentuk jantung	Berbentuk oval
33	Kondisi braktea	Tertutup
34	Warna braktea bagian dalam	Ungu
35	Bentuk braktea bagian ujung	Lebar meruncing

pada tanaman mixoploid, semua karakter kualitatif sama seperti pisang tetraploid. Beberapa karakter kuantitatif seperti tinggi batang semu, diameter batang semu, panjang dan lebar daun, panjang tangkai daun, dan lebar buah menunjukkan tanaman Pisang Mas Lumut tetraploid memiliki nilai yang lebih besar dibandingkan dengan tanaman Pisang Mas Lumut diploid (Tabel 3).

Karakterisasi molekuler Pisang Mas Lumut hasil induksi poliploidi

Hasil amplifikasi total genom DNA dengan menggunakan 10 primer ISSR pada 52 sampel Pisang Mas dan 4 sampel Pisang Klutuk diperoleh 108

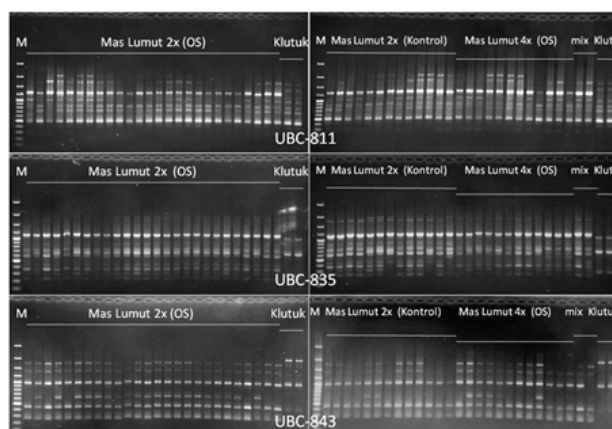
fragmen DNA yang berukuran dari 200 bp hingga 2.0kb, 83,33% di antaranya merupakan fragmen DNA polimorfik. Ke-10 primer menghasilkan 2-11 fragmen DNA, dan setiap primer menghasilkan rata-rata 8 pita DNA yang dapat dideteksi dan diskor. Hasil PCR dengan tiga primer (UBC-811, UBC-835 dan UBC-843) dapat dilihat pada Gambar 2.

Selanjutnya untuk mengetahui sebaran fenotip ISSR antar populasi, dibuat kladogram pengelompokan berdasarkan jarak genetik (Nei, 1978) (Gambar 3). Kladogram yang dibuat dengan metode UPGMA menunjukkan hubungan kekerabatan genetik antara populasi yang dianalisis berdasarkan matrik *Nei's genetic distance* di antara populasi (Tabel 3). Secara umum, populasi Pisang Mas Lumut dan

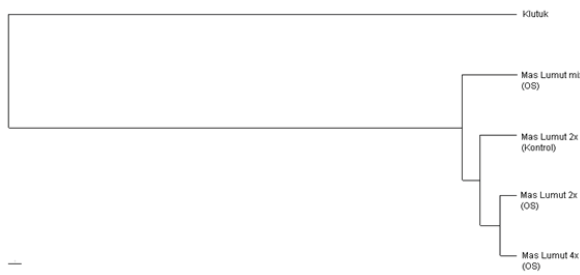
Klutuk membentuk dua kelompok. Kelompok pertama terdiri populasi Pisang Klutuk dan kelompok kedua yang terdiri atas 4 populasi Pisang Mas Lumut yaitu mixoploid, diploid (kontrol), diploid (OS) dan tetraploid (OS). Ke-4 populasi Pisang Mas Lumut ini mengelompok menjadi satu. Identitas/kesamaan genetik (Nei 1972) yang tinggi juga diamati antar populasi Pisang Mas Lumut, yaitu berkisar antara 0.90-0.97 (Tabel 4). Identitas/kesamaan genetik tertinggi (0.97) terdapat antara Pisang Mas Lumut 2x hasil induksi poliploidi (OS) dengan Pisang Mas Lumut 4x (OS), yang diikuti oleh nilai 0.95 antara Pisang Mas Lumut 2x (Kontrol) dengan Pisang Mas Lumut 2x (OS).

Tabel 3. Penampilan karakter kuantitatif Pisang Mas Lumut tetraploid.

No	Karakter	Pisang Mas Lumut 2x	Pisang Mas Lumut 4x
1	Jumlah anakan	3.25 ± 0.77	2.0 ± 0.0
2	Tinggi batang semu	209.86 ± 27.37	263.75 ± 39.20
3	Diameter batang	11.69 ± 0.73	17.51 ± 1.41
4	Panjang tangkai daun	41.25 ± 8.05	45.5 ± 0.71
5	Panjang daun	191.50 ± 16.69	203.5 ± 12.02
6	Lebar daun	51.0 ± 1.29	52.75 ± 1.41
7	Rasio panjang/lebar daun	3.63 ± 0.42	4.0 ± 0.13
8	Panjang tangkai tandan	30.75 ± 4.47	31.60 ± 4.80
9	Diameter tangkai tandan	4.52 ± 0.32	4.42 ± 0.48
10	Panjang tandan	102.25 ± 6.88	104.33 ± 3.21
11	Diameter tandan	21.65 ± 3.32	22.32 ± 4.33
12	Jumlah sisir	6.44 ± 1.06	8.00 ± 3.21
13	Panjang buah	10.46 ± 1.13	10.67 ± 0.59
14	Lebar buah	3.75 ± 0.33	4.12 ± 0.5
15	Panjang tangkai buah	1.22 ± 0.26	1.17 ± 0.06
16	Tebal kulit buah	0.37 ± 0.17	0.23 ± 0.06



Gambar 2. Profil DNA Mas Lumut hasil perlakuan oryzalin dan Klutuk dengan menggunakan primer UBC-811, UBC-835 dan UBC-843.



Gambar 3. Cladogram Mas Lumut hasil perlakuan dengan oryzalin dan Klutuk berdasarkan jarak genetik (Nei 1978).

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini skrining tingkat ploidi dilakukan dengan Flowcytometry, hasil penelitian menunjukkan setelah sub-kultur ke-6, terdapat 65% diploid, 30% tetraploid dan 5% mixoploid (Tabel 1). Efektivitas perlakuan oryzalin dalam menghasilkan tanaman pisang tetraploid pada penelitian ini relatif sama dengan penelitian serupa yang dilakukan oleh van Duren *et al.* (1996) yaitu 29%. Demikian juga tanaman tetraploid yang dihasilkan merupakan tanaman yang solid tetraploid, bukan chimera. Tanaman tetraploid tersebut juga ternyata stabil setelah dua siklus tanaman yang menunjukkan tetraploid solid, dan tidak chimera. Walaupun demikian 5% tanaman hasil induksi merupakan tanaman mixoploid. Mixoploid merupakan kimera ploidi hasil dari regenerasi paling sedikit dua sel dengan tingkat ploidi yang berbeda Poerba dkk (2012). Mixoploid (chimera) dapat dihilangkan dengan sub-kultur terus menerus, pada penelitian ini mixoploid

tetap belum dapat dipisahkan hingga sub-kultur ke-6. Demikian pula setelah dua siklus tanaman, tanaman mixoploid masih stabil.

Pada penelitian ini tanaman Pisang Mas Lumut tetraploid menunjukkan tinggi dan diameter batang semu, panjang dan lebar daun yang lebih besar dari tanaman Pisang Mas Lumut diploid (kontrol) (Tabel 3), habitus daun yang merunduk (sedangkan tanaman diploid Mas Lumut memiliki habitus daun yang tegak) (Tabel 2) serta jumlah anakan yang lebih sedikit dibandingkan dengan diploid Mas Lumut (kontrol) (Tabel 3). Hal ini sejalan dengan penelitian Vakili (1967) yang menyatakan bahwa tanaman pisang tetraploid pada umumnya menunjukkan ukuran tanaman yang lebih tinggi, lebih kuat, habitus daun yang merunduk, waktu pertumbuhan yang lebih lama, jumlah anakan dan sistem akar lebih sedikit dibandingkan dengan tanaman diploidnya (Vakili 1967). Demikian juga Hamill *et al.* (1992) menyatakan bahwa autotetraploid memiliki daun yang besar, tangkai daun mudah patah, merunduk dan diameter batang semu yang lebih besar dibandingkan tanaman diploidnya, tetapi tangkai daun mudah patah dan memiliki sedikit anakan. Tanaman tetraploid menunjukkan daun yang lebih panjang dan lebih lebar, serta tandan buah yang lebih besar dibandingkan tanaman diploid pada *Musa acuminata* 'Kluai Leb Mu Nang' dan 'Kluai Sa' (Kanchanapoom & Koarapachaikul 2012).

Pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa tetraploidi tidak mempengaruhi panjang buah Pisang Mas Lumut, tetapi diameter/lebar buah menjadi

Tabel 4. Matriks identitas/kesamaan genetik dan jarak genetik (Nei, 1978) pada Mas Lumut hasil induksi ploiploidi dan Pisang Klutuk

	Mas Lumut 2x (Kontrol)	Mas Lumut 2x (OS)	Mas Lumut 4x (OS)	Mas Lumut mix (OS)	Klutuk 2x
Mas Lumut 2x (Kontrol)	-	0.95	0.94	0.90	0.46
Mas Lumut 2x (OS)	0.05	-	0.97	0.93	0.44
Mas Lumut 4x (OS)	0.07	0.03	-	0.92	0.49
Mas Lumut mix (OS)	0.10	0.07	0.08	-	0.45
Klutuk 2x	0.77	0.81	0.71	0.81	-

Identitas genetik (diatas diagonal), jarak genetik (dibawah diagonal)

lebih besar dibandingkan tetua diploidnya (Tabel 3). Penelitian lain menunjukkan tetraploidi mempengaruhi ukuran dan bentuk buah pada *Musa balbisiana* dan *Musa acuminata* subsp. *banksii*, tidak mempengaruhi ukuran tandan (jumlah sisir yang terbentuk) pada *Musa acuminata* subsp. *banksii*, tetapi mengurangi ukuran tandan pada *Musa acuminata* subsp. *microcarpa* 'zebrina' (Vakili 1967). Penelitian yang dilakukan Bakry *et al.* (2007) yang menghasilkan tetraploid dari 21 klon diploid yang diinduksi dengan colchicine menunjukkan penampilan tanaman tetraploid yang lemah dibandingkan tanaman diploidnya, tetapi semua tetraploid berbunga dan dapat disilangkan dengan tanaman diploid dan menghasilkan hibrid triploid. Hasil penelitian Pisang Mas Lumut tetraploid ini menunjukkan bahwa pisang Mas Lumut tetraploid juga dapat berbunga dan berbuah selama penelitian dua siklus dan dapat disilangkan dengan dengan varietas lain, namun tingkat ploidi hibrid belum dapat diidentifikasi, masih dalam tahap kultur embrio.

Pada penelitian ini, pisang Mas Lumut tetraploid dan mixoploid menunjukkan jumlah anakan lebih sedikit, pertumbuhan daun yang lebih merunduk dengan tangkai daun yang mudah patah, tinggi dan diameter batang semu lebih besar, panjang daun dan tangkai daun lebih besar, lebar buah yang lebih besar dibandingkan dengan tanaman diploidnya (Tabel 2, Tabel 3). Hal ini terjadi karena senyawa oryzalin menyebabkan kegagalan fungsi normal *spindle* tahap metaphase mitosis, sehingga sel tidak membelah menjadi dua, akibatnya jumlah kromosom menjadi ganda dan ukuran sel menjadi lebih besar (van Duren *et al.* 1996).

Hasil karakterisasi molekuler menunjukkan properti genetik Pisang Mas Lumut hasil induksi poliploidi tidak berubah karena ploidisasi. Induksi poliploidi tidak merubah properti kromosom, hanya terjadi penggandaan kromosom dengan dihambatnya pembentukan *spindle* oleh senyawa oryzalin pada tahap metaphase mitosis sel (van Duren *et al.* 1996).

KESIMPULAN

Hasil penelitian induksi tetraploid Pisang Mas Lumut dengan oryzalin menghasilkan 65% tanaman diploid, 30% tanaman tetraploid dan 5% tanaman mixoploid. Efektivitas oryzalin dalam menghasilkan pisang tetraploid solid, non-chimera Mas Lumut relatif tinggi (30%). Tanaman Pisang Mas Lumut tetraploid hasil induksi poliploidi menunjukkan jumlah anakan lebih sedikit, pertumbuhan daun yang lebih merunduk, tinggi dan diameter batang semu lebih besar, daun lebih besar, serta buah yang lebih lebar dibandingkan dengan tanaman diploidnya. Pisang Mas Lumut hasil induksi poliploidi memiliki properti genetik yang mirip dengan kontrolnya dengan indeks kesamaan genetik yang berkisar antara 0.90-0.97.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian di dadanai oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia melalui Program Kompetitif, Sub Program Eksplorasi dan Pemanfaatan terukur Sumber Daya Hayati (Darat dan Laut) Indonesia tahun 2009-2013. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada K.Utami Nugraheni SP, Nuriyanto SP, Herlina, Desy Sukmawati SSI, Rizki Kahzar SSI, Yuli dan Dian, yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Asif, MJ., C. Mak & OR. Yasmin. 2000. Polyloid induction in a local wild banana (*Musa acuminata* var *malaccensis*). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3(5):740-743.
- Bakry, F., N. Pa de la Reberdiere, S. Pichot & C. Jenny. 2007. In liquid medium colchicine treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. *Fruits* 62(1): 3-12.
- Bakry, F., F. Carreel, C. Jenny & JP. Horry.

2009. Genetic improvement of banana. Dalam Mohan Jain Shri, PM Priyadarshan (eds.). *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. New York: Springer. 3–50.
- Delaporta, SL., J. Wood & JB. Hicks. 1983. A Plant DNA Minipreparation. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 4: 19–21.
- Doležel, J., M. Valárik, MA. Vrána Lysák, E. Hřibová, J. Bartos, N. Gasmanova, M. Dolezelova, J. Safar & H. Simkova. 2004. Molecular cytogenetics and cytometry of bananas (*Musa* spp.). Dalam SM Jain and R Swennen (eds). *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutation*. Science Publishers, Inc, Enfield (NH), USA, Plymouth, UK. 229-244
- Dhooghe, E., S. Denis, T. Eeckhaut, D. Reheul, MC. van Labeke. 2009. In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. *Euphytica* 168:33–40.
- Ganga, M. & N. Chezhayan. 2002. Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). *J Horticult Sci Biotechnol* 77:572–575.
- Hamil, SD., MK. Smith & WA. Dodd. 1992. In vitro induction of banana autotetraploid by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Aust. J. Bot.* 42:887-96.
- Kanchanapoom, K. & K. Koarapatchaikul. 2012. In vitro induction of tetraploid plants from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) 'Kluai Leb Mu Nang' and 'Kluai Sa'. *Euphytica* 183:111-117.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Nei, M. 1972. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70 (12):3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Oselebe, HO, IU. Obi & MI. Uguru. 2010. Predicting hybrids performances from inter-ploidy crosses in *Musa* species. *Australian Journal of Crops Science* 4(6):425-420.
- Page, RDM. 1998. TreeView (Win 32). Available at <http://www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>.
- Poerba, YS. & F. Ahmad. 2010. Keragaman Genetik Kultivar Pisang Diploid (AA) Koleksi Cibinong Science Center Berdasarkan Marka RAPD dan ISSR. *Biota* 15(3):308-315.
- Poerba, YS., F. Ahmad & Witjaksono. 2012. Persilangan pisang liar diploid *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (Ridl.) Nasution sebagai sumber polen dengan Pisang Madu tetraploid. *Jurnal Biologi Indonesia* 8(1):181-196.
- Pusat Perlindungan Varietas dan Perizinan Pertanian 2013. <http://ppvt.setjen.deptan.go.id/ppvtpp/files/vhp-2013.pdf>.
- Retnoningsih, A., R. Megia & A. Hartana. 2009. Microsatellite markers for classifying and analyzing genetic relationship between banana cultivars in Indonesia. *Proceedings of International ISHS-ProMusa Symposium on Global Perspectives on Asian Challenges*. 153-160.
- Rodrigues, FA., JDR. Soares, RR. Santos, M. Pasqual & SO. Silva. 2011. Colchicine and amiprofos-methyl (AMP) in polyploidy induction in banana plant. *African Journal of Biotechnology* 10(62): 13476-13481.
- Roux, N., R. Afza., H. Brunner, R. Morpurgo R. & M. Van Duran. 1994. Complementary approaches to crossbreeding and mutation breeding. *Proceedings of the First Global Conference at the International Conference at the International Musa testing program held at FHIA, Honduras (27-30 April, 1994)*. 213-18.
- Simmonds, NW. & K. Shepherd. 1955. The

- taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Linnean Society. Botanical J.* 55: 302-312.
- Stover, RH. & NW. Simmonds. 1987. *Bananas*. Longman Sci & Technical, Essex, England. 3rd Edition.
- Sumardi, I & M. Wulandari. 2010. Anatomy and morphology character of five Indonesian banana cultivars (*Musa* spp.) of different ploidy level. *Biodiversitas* 11(4):167-175.
- Uma. S, MS. Saraswathi, M.Manickavasagam, S.Sathiamoorthy & G. Rajagopal. 2004. Effect of polyploidizing agents on cvs 'Matti' (AA) and 'Kunnan' (AB). Proceeding of 1st International Congress on Musa. Harnessing research to improve livelihoods, Penang, Malaysia, 6-9 July, 2004. 18
- UPOV – International Union for the Protection of New Varieties of Plants. 2010. *Banana: Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability*. Avail-label at <http://www.upov.int/>
- Vakili, NG. 1967. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. *Amer. J. Bot.* 54(1):24-36
- Yeh, FC., RC. Yang & T. Boyle. 1999. Popgene Version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for Population Genetic Analysis. Available at: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>