

**Pembentukan dan Penampilan Pisang Rejang Hibrid Triploid Hasil Persilangan Pisang Rejang Mixoploid Dengan Pisang Rejang Diploid (Generating and Performance of Triploid Hybrid Rejang from Mixoploid Rejang with Diploid Rejang Banana)**

**Yuyu S. Poerba, Witjaksono, & Tri Handayani**

Pusat Penelitian Biologi – LIPI, Jalan Raya Jakarta- Bogor Km 46, Cibinong, Kabupaten Bogor 16911

Email: yuyupoerba@gmail.com

**Memasukkan:** Maret 2015, **Diterima:** Agustus 2015

**ABSTRACT**

Induction of tetraploid from diploid bananas often producing mixoploid plants. Characters of the mixoploid plant is similar to those of tetraploid plants. In this research mixoploid banana cultivar Rejang was crossed with diploid Rejang to produce triploid hybrid Rejang. Triploid banana is one of plant breeding target because of its best vigor and productivity compared to diploid or tetraploid banana. 570 crosses were conducted with mixoploid Rejang as female parents and diploid Rejang as male parents. Out of 570 crosses, 130 hybrid seeds were produced. However, only 19 seeds (14.61%) contained embryos, and only two embryos were developed into shoots. The two genotypes of developed embryos were then in-vitro propagated and planted in the field. Results of ploidy identification using Flowcytometer showed that the two genotypes were diploids (31%) and triploids (69%). The triploid hybrid Rejang had plant growth habit of drooping, few suckers, higher and bigger pseudostem, higher bunch weight and fruit weight compared to those of the two parents. The triploid hybrid had similar genetic properties with genetic identity of 0.9174-0.9703.

**Keywords:** Banana, crosses, diploid, Rejang, mixoploid, triploid, hybrids

**ABSTRAK**

Induksi pisang tetraploid dari pisang diploid seringkali menghasilkan pisang mixoploid. Karakter pisang mixoploid ini mirip dengan pisang tetraploid. Pada penelitian ini pisang Rejang mixoploid disilangkan dengan pisang Rejang diploid untuk menghasilkan pisang Rejang triploid. Pisang triploid merupakan salah satu target pemuliaan tanaman pisang karena pisang triploid memiliki vigor dan produktifitas yang paling baik dibandingkan dengan pisang diploid atau tetraploid. Sejumlah 570 persilangan dilakukan dengan pisang Rejang mixoploid sebagai tetua betina dan pisang Rejang diploid sebagai tetua jantan. Dari 570 penyerbukan yang dilakukan dihasilkan 130 biji. Namun demikian, dari 130 biji hibrid pisang yang dihasilkan, hanya 19 (14.61%) saja yang mengandung embrio, dan hanya dua embrio saja yang hidup dan berkembang menjadi tunas. Dua genotip hibrid pisang yang bertunas, kemudian diperbanyak secara *in vitro*, dan selanjutnya diaklimatisasi di rumah kaca serta ditanam di kebun. Hasil identifikasi tingkat ploidi kedua genotip hibrid ini menunjukkan diploid (31%) dan triploid (69%). Pisang Rejang hibrid triploid memiliki pertumbuhan daun yang merunduk, jumlah anakan sedikit, tinggi dan diameter batang semu lebih besar dari kedua tetuanya, serta memiliki bobot tandan dan buah lebih tinggi daripada kedua tetuanya. Pisang Rejang hibrid triploid memiliki properti genetik yang identik dengan kedua tetuanya dengan tingkat kesamaan genetik antara 0.9174-0.9703.

**Kata Kunci:** Pisang, persilangan, diploid, Rejang, mixoploid, triploid, hibrid

**PENDAHULUAN**

Pisang triploid merupakan salah satu target pemuliaan tanaman pisang karena pisang triploid memiliki vigor dan produktifitas yang paling baik dibandingkan dengan pisang diploid atau tetraploid. Pemuliaan pisang triploid memiliki kendala karena sistem genetik pisang yang kompleks. Partenokarpi (pembentukan buah tanpa tanpa melalui proses fertilisasi, sehingga buah terbentuk tanpa biji),

rendahnya fertilitas serbuk sari, inkompatibilitas, tingkat ploidi yang berbeda (diploid, triploid, tetraploid), serta susunan genom yang berbeda (AA, BB, AAB, ABB, AAAB) menyebabkan persilangan sulit dilakukan.

Induksi pisang tetraploid dari pisang diploid dengan menggunakan zat kimia yang menghambat pembentukan *spindle fiber* seperti kolkhisin dan oryzalin telah banyak digunakan (Vakili 1967, Hamill *et al.* 1992, Asif *et al.* 2000, Rodrigues *et*

al. 2011, Kanchanapoom& Koarapachaikul 2012, Pio *et al.* 2014, Poerba *et al.* 2012, 2014). Namun dalam prosesnya, hasil induksi dengan oryzalin tidak hanya menghasilkan pisang tetraploid, tetapi juga terbentuknya pisang mixoploid, yaitu terdapatnya dua macam ploidi pada satu individu tanaman (van Duren *et al.* 1996; Roux *et al.* 1999, Asif *et al.* 2000, Rodrigues *et al.* 2011, Kanchanapoom & Koarapachaikul 2012, Pio *et al.* 2014; Poerba *et al.* 2012, 2014). Terbentuknya mixoploid dapat terjadi karena oryzalin tidak sepenuhnya mencapai sel-sel yang sedang aktif membelah (Carvalho *et al.* 2005). Terjadinya pembentukan pisang mixoploid ini bervariasi antara 5% hingga 25% (Poerba *et al.* 2012, 2014). Tunas in-vitro pisang mixoploid dapat dipisahkan dengan sub-kultur beberapa kali (4-5 kali) pada beberapa kultivar (Roux *et al.* 1999), tetapi pada kultivar lain, tunas mixoploid belum dapat dipisahkan, perlu lebih dari 5 sub-kultur.

Secara umum, penampilan tanaman pisang mixoploid tidak berbeda dengan tanaman pisang tetraploid baik dari karakter kuantitatif maupun pada karakter kualitatif (Poerba *et al.* 2012, 2014) dan mampu menghasilkan buah seperti pisang tetraploid dan diploidnya.

Pada penelitian ini tanaman pisang Rejang mixoploid hasil induksi poliploid dengan oryzalin, dimanfaatkan untuk menghasilkan pisang triploid dengan menyilangkannya dengan tetua jantan diploid. Pisang triploid merupakan salah satu target pemuliaan tanaman pisang karena pisang triploid memiliki vigor dan produktifitas yang paling baik dibandingkan dengan pisang diploid atau tetraploid.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Pisang Rejang mixoploid (AA-AAAA) hasil induksi poliploidi dari Pisang Rejang diploid digunakan sebagai tetua betina untuk diserbuki dengan serbuk sari dari tetua jantan Pisang Rejang diploid (AA). Tetua betina Pisang Rejang mixoploid memiliki diameter buah yang lebih besar dibandingkan dengan diploidnya, sedangkan tetua jantan, Pisang Rejang diploid memiliki fertilitas polen yang tinggi, rasa yang enak, manis dan tahan terhadap penyakit layu Fusarium yang disebabkan oleh patogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical race 4 (Foc-TR4) (Sutanto *et al.* 2014).

Sejumlah 570 penyerbukan dilakukan dengan mengambil serbuk sari dari pisang Rejang diploid dan menyerbukkannya pada bunga betina Pisang Rejang mixoploid. Penyerbukan dilakukan pada pagi hari antara jam 8-10, pada saat putik bersifat *receptive* dan serbuk sari matang. Setelah penyerbukan, tandan bunga ditutup dengan jaring halus (*insect net*) untuk mencegah penyerbukan silang oleh serangga atau penyerbuk lainnya. Semua penyerbukan diberi label sesuai tetua persilangan, tanggal dan jumlah penyerbukan. Buah hasil persilangan dipanen pada saat buah masak fisiologis.

Biji hibrid hasil persilangan diekstrak dari buah yang sudah masak penuh dan lunak dan diberi label sesuai persilangannya. Selanjutnya biji diselamatkan dengan teknik *embryo rescue*. Biji yang telah dipilih didisinfestasi dengan larutan Bayclin 20% selama 10-20 menit dan dibilas akuades steril 2x dalam *laminar air flow cabinet*. Setelah dikeringkan, biji diiris longitudinal terhadap pada sisi sebelah mikrofil. Embrio yang berwarna putih opak diambil dengan ujung skalpel dan di letakkan pada permukaan medium tumbuh. Medium tumbuh berisi garam formulasi MS (Murashige & Skoog 1962), 30 g l<sup>-1</sup> gula, 100 mg l<sup>-1</sup> myo inositol, 4 mg l<sup>-1</sup> thiamine HCl dengan tambahan 2 mg/l BA.

Biak tunas yang telah berhasil diiniasiasi dipelihara dan diperbanyak dengan subkultur 1-3 bulan pada medium garam formulasi MS (Murashige & Skoog 1962), 30 g l<sup>-1</sup> gula, 100 mg l<sup>-1</sup> myo inositol, 4 mg l<sup>-1</sup> thiamine HCl dan 2 mg l<sup>-1</sup>BA dan dipadatkan dengan 8 g/l agar. Setelah tunas bertumbuh menjadi *plantlet*, selanjutnya diaklimatisasi di rumah kaca. Aklimatisasi dilakukan dengan mengadaptasikan biak tunas pisang dari kondisi *in vitro* dengan kelembaban tinggi dan intensitas cahaya rendah ke kondisi *ex vitro* dengan kelembaban rendah dan intensitas cahaya tinggi 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%. 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.

Hibrid yang sudah ditanam di lapang diamati pertumbuhan dan perkembangannya. Evaluasi karakter kualitatif dan kuantitatif pisang hibrid dilakukan sesuai dengan Descriptors for Banana (*Musa* spp.) (IPGRI-INIBAP/CIRAD 1996) dan UPOV (2010).

Hibrid hasil persilangan diidentifikasi secara molekuler dengan menggunakan marka Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan metoda CTAB (Delaporta *et al.* 1983) yang sudah dimodifikasi (Poerba *et al.* 2014). Analisis ISSR dilakukan terhadap 24 sampel Pisang Rejang hibrid dan 2 sampel masing-masing kedua tetuanya dengan menggunakan 8 primer ISSR (UBC-811, UBC-814, UBC-815, UBC-822, UBC-823, UBC-834, UBC-835, 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 MgCl<sub>2</sub>; 25 ng DNA sample; 1 pmole primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) dengan menggunakan 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 transiluminator, kemudian difoto dengan menggunakan gel documentation 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 jarak genetik antar populasi yang dihitung dengan menggunakan Nei's *unbiased genetic distances* (Nei 1978) dengan program

POPGENE software (Yeh *et al.* 1999).

Analisa ploidi 45 sampel pisang Rejang hibrid, dua sampel tetua betina, dan dua sampel tetua jantan menggunakan protokol dari Doležel *et al.* (2004) dengan menggunakan larutan Cystain UV-ploidy (Partec, Germany) yang berisi *buffer* dan pewarna DNA. Potongan daun berukuran sekitar 1cm<sup>2</sup> diambil dari tanaman sampel, diberi label dan disimpan di dalam tissue basah. Daun kemudian dipotong 0,5 cm<sup>2</sup> diletakkan di *petridish* dan ditetesi 1,5 ml *buffer cystain UV-Ploidy* (Partec, Germany) dan dicacah dengan silet. Cacahan daun disaring dengan saringan 30 µm dan filtrat di masukkan dalam tabung *cuvette* untuk analisa. Sampel dibaca pada panjang gelombang 440 nm dan kecepatan 1000 *nuclei* per detik. Jumlah DNA pada inti sel sampel kontrol tanaman diploid dikalibrasi pada *channel* 200. Data ditunjukkan dalam bentuk grafik. Tanaman diploid menunjukkan *peak* (puncak) pada *channel* 200, triploid pada *channel* 300 dan tetraploid pada *channel* 400, dan tanaman *mixoploid* menunjukkan lebih dari 1 *peak* pada *channel* yang berbeda. Rata-rata kandungan DNA (*mean*) dan *coefficient of variation* (CV) dari tiap-tiap sampel pada setiap *peak* diamati dan dibandingkan dengan tanaman kontrol, dan ditentukan tingkat ploidinya sesuai dengan kelipatan rata-rata jumlah kandungan DNA.

## HASIL

### Persilangan pisang Rejang mixoploid dengan Pisang Rejang diploid

Dari 24 kombinasi persilangan (570 penyerbukan), hanya 14 kombinasi persilangan yang menghasilkan biji (130 biji), dan hanya lima kombinasi persilangan yang menghasilkan biji yang mengandung embrio (19 embrio) (Tabel 1). Dengan teknik kultur *embryo rescue*, ke-19 embrio ini kemudian diselamatkan. Walaupun demikian, tidak semua embrio dapat hidup dan bertumbuh, dan hanya dua embrio (10.53%) saja yang hidup dan berkembang menjadi tunas. Kedua embrio yang hidup ini berasal dari persilangan antara aksesi I 11A#3(3) x I 11B#4 (Tabel 1).

Dari dua genotip embrio hibrid pisang yang bertunas, kemudian diperbanyak secara *in vitro*, dan selanjutnya diaklimatisasi di rumah kaca serta ditanam di kebun. Hasil identifikasi tingkat ploidi kedua genotip hibrid ini menunjukkan diploid (31%) dan triploid (69%) (Tabel 1)

**Tabel 1.** Persilangan Pisang Rejang mixoploid dengan Pisang Rejang diploid

No	Persilangan (mix x 2x)	Persilangan	Jumlah		
			Biji	Embrio	Embrio yang bertunas
1	I 11A#2 x I 11B#2	58	0	0	0
2	I 11A#3 x I 11B#4	70	0	0	0
3	I 11A#1 x II 21B#1	37	0	0	0
4	I 11A#2 x II 21B#2	15	1	0	0
5	I 11A#2(2) x II 21B#2	12	3	1	0
6	I 11A#2(3) x II 21B#2	10	2	0	0
7	I 11A#2(4) x II 21B#2	12	4	0	0
8	I 11A#2(5) x II 21B#2	12	18	0	0
9	I 11A#2(6) x II 21B#2	12	5	0	0
10	I 11A#2(7) x II 21B#2	13	6	0	0
11	I 11A#2(8) x II 21B#2	13	0	0	0
12	I 11A#2(9) x II 21B#2	14	53	3	0
13	I 11A#3(2) x I 11B#4	15	18	7	0
14	I 11A#3(3) x I 11B#4	13	13	7	2
15	I 11A#3(4) x I 11B#4	12	1	0	0
16	I 11A#3(5) x I 11B#4	14	3	1	0
17	I 11A#3(6) x I 11B#4	12	0	0	0
18	I 11A#3(7) x I 11B#4	12	1	0	0
19	I 11A#3(8) x I 11B#4	12	2	0	0
20	I 11A#4 x II 21B#3	46	0	0	0
21	II 11A#3 x II 21B#5	13	0	0	0
22	II 7A#1 x II 21B#1	22	0	0	0
23	II 7A#1 x II 21B#5	37	0	0	0
24	II 7A#1 x II 21B#3	49	0	0	0
	Jumlah	570	130	19	2

### Identifikasi tingkat ploidi hybrid dengan Flowcytometer

Dari sejumlah 45 tanaman pisang Rejang hybrid yang diamati ternyata 33 diantaranya merupakan triploid dan 12 tanaman pisang Rejang hybrid merupakan diploid yang dikonfirmasi dengan Flowcytometer (Tabel 2, Gambar 1).

### Penampilan karakter vegetatif tanaman pisang Rejang hybrid

Rejang hybrid triploid memiliki jumlah anakan yang sedikit (< 5 anakan), dibandingkan dengan tetua jantan Rejang diploid (12 anakan). Habitus tanaman pisang Rejang hybrid triploid menyerupai tanaman pisang Rejang mixoploid yaitu memiliki pola pertumbuhan daun yang merunduk (*drooping*) (Gambar 2), sedangkan penampilan (habitus) tanaman pisang hybrid diploid menyerupai tanaman

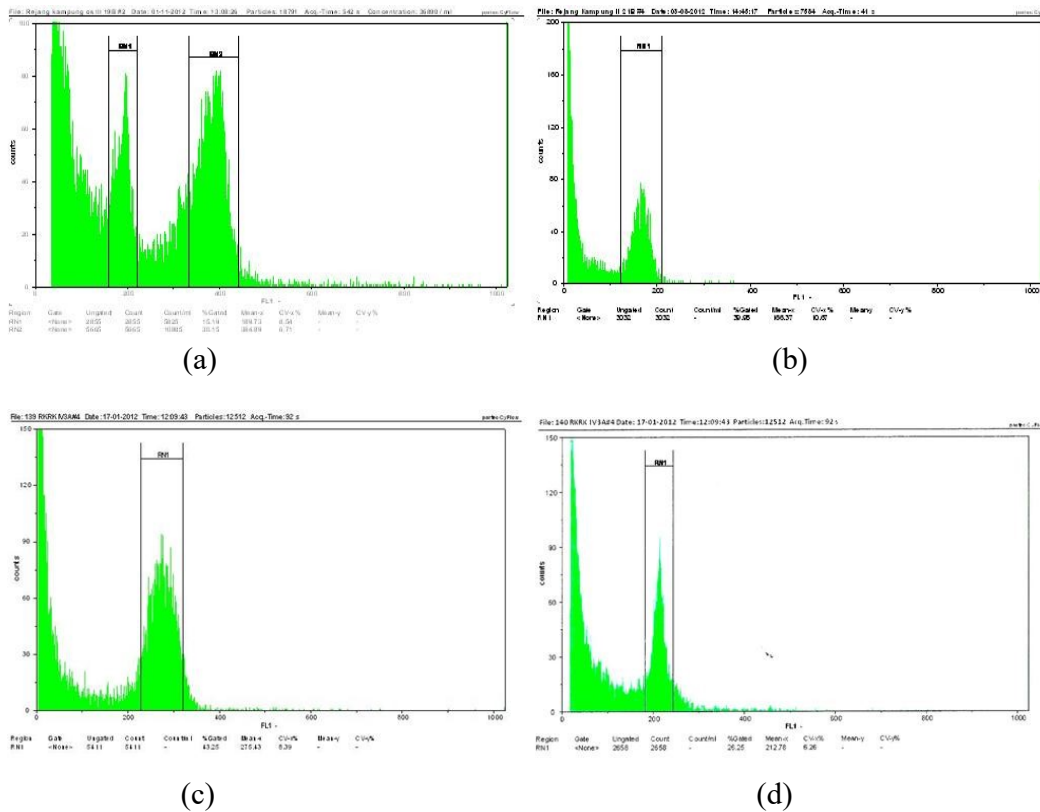
tetua jantan diploid yaitu tegak (Gambar 2) (Tabel 3).

Pisang Rejang hybrid triploid memiliki ukuran tinggi dan diameter batang semu, panjang dan lebar daun serta tangkai daun yang lebih besar dibandingkan dengan kedua tetuanya (Tabel 3). Pisang Rejang hybrid triploid memiliki batang semu berbentuk silinder dengan tinggi mencapai 2,3 m, berwarna hijau kekuningan. Warna yang dominan pada batang semu bagian dalam adalah pigmentasi merah muda-merah (Gambar 2).

Lapisan lilin pada lembaran daun pisang Rejang hybrid triploid sangat sedikit seperti kedua tetuanya. Permukaan daun bagian atas berwarna hijau tidak mengkilap dan daun bagian bawah sangat sedikit mengandung lilin. Bagian kiri dan kanan pangkal daun berukuran tidak sama (asimetris) dengan kedua sisi daun meruncing seperti kedua tetuanya. Demikian pula pola lekuk sayap tangkai

**Tabel 2.** Hasil pengukuran tingkat ploidi pisang Rejang hibrid dengan menggunakan Flowcytometer

No	No Aksesori	Kode Tetua/hibrid	Mean	CV(%)	Ploidi
<b>Pisang Rejang mixoploid (tetua betina)</b>					
1	I 11A#3a	RKm	165.16	8.86	Mixoploid
		RKm	346.64	5.5	
2	I 11A#3b	RKm	163.24	8.83	Mixoploid
			336.96	6.54	
<b>Pisang Rejang diploid (tetua jantan)</b>					
1	I 11B#4a	RK	177.67	7.27	2x
2	I 11B#4b	RK	177.31	9.33	2x
<b>Hibrid Pisang Rejang mixoploid x Pisang Rejang diploid</b>					
1	III 16C#1	RKRK	329.82	3.74	3x
2	III 16C#4	RKRK	343.6	3.24	3x
3	III 16C#5	RKRK	333.25	3.47	3x
4	III 17B#1	RKRK	282.04	9.32	3x
5	III 17B#2	RKRK	294.75	8.99	3x
6	III 17B#3	RKRK	306.99	8.44	3x
7	III 17B#4	RKRK	289.67	6.9	3x
8	III 17B#5	RKRK	295.69	9.97	3x
9	III 17D#1	RKRK	294.45	8.14	3x
10	III 17D#2	RKRK	272.59	7.22	3x
11	III 17D#4	RKRK	346.98	6.44	3x
12	III 17D#5	RKRK	337.24	5	3x
13	III 18C#1	RKRK	296.34	7.03	3x
14	III 18C#2	RKRK	268.81	8.03	3x
15	III 18C#3	RKRK	290.97	7.29	3x
16	III 18D#1	RKRK	282.28	6.74	3x
17	III 18D#2	RKRK	279.5	10.17	3x
18	III 18D#3	RKRK	290.56	8.94	3x
19	III 18D#4	RKRK	304.78	8.86	3x
20	III 18D#5	RKRK	274.48	8.3	3x
21	IV 3A#1	RKRK	273.21	8.4	3x
22	IV 3A#2	RKRK	344.05	5.17	3x
23	IV 3A#3	RKRK	261.37	9.15	3x
24	IV 3A#4	RKRK	276.54	8.39	3x
25	IV 3A#5	RKRK	263.84	7.71	3x
26	IV 3B#1	RKRK	308.14	5.88	3x
27	IV 3B#2	RKRK	303.02	4.33	3x
28	IV 3B#3	RKRK	303.01	7.66	3x
29	IV 3B#4	RKRK	270.33	8.57	3x
30	IV 8E#1	RKRK	319.7	5.52	3x
31	IV 8E#2	RKRK	323.32	5.38	3x
32	IV 8E#3	RKRK	314.52	6.29	3x
33	IV 8E#4	RKRK	319.83	5.37	3x
34	III 16C#3	RKRK	194.11	9.49	2x
35	III 19C#1	RKRK	185.12	7.39	2x
36	III 19C#2	RKRK	194.74	8.89	2x
37	III 19C#3	RKRK	202.41	8.24	2x
38	III 19C#4	RKRK	179.42	8.35	2x
39	III 19C#5	RKRK	187.3	9.73	2x
40	IV 3B#5	RKRK	232.77	8.9	2x
41	IV 8E#1	RKRK	212.86	6.27	2x
42	IV 8E#2	RKRK	225.84	8.19	2x
43	IV 8E#3	RKRK	212.63	9.35	2x
44	IV 8E#4	RKRK	172.75	9.98	2x
45	IV 8E#5	RKRK	212.54	6.01	2x



**Gambar 1.** Contoh grafik hasil flowcytometer: (a) Pisang Rejang mixoploid (b) Pisang Rejang diploid (c) Pisang Rejang hibrid triploid dan (d) Pisang Rejang hibrid diploid

daun (*petiole canal*) pada daun ketiga tanaman hibrid terbuka dengan tepi lurus, seperti kedua tetuanya (Tabel 3, Gambar 2).

**Penampilan karakter generatif tanaman pisang Rejang hibrid**

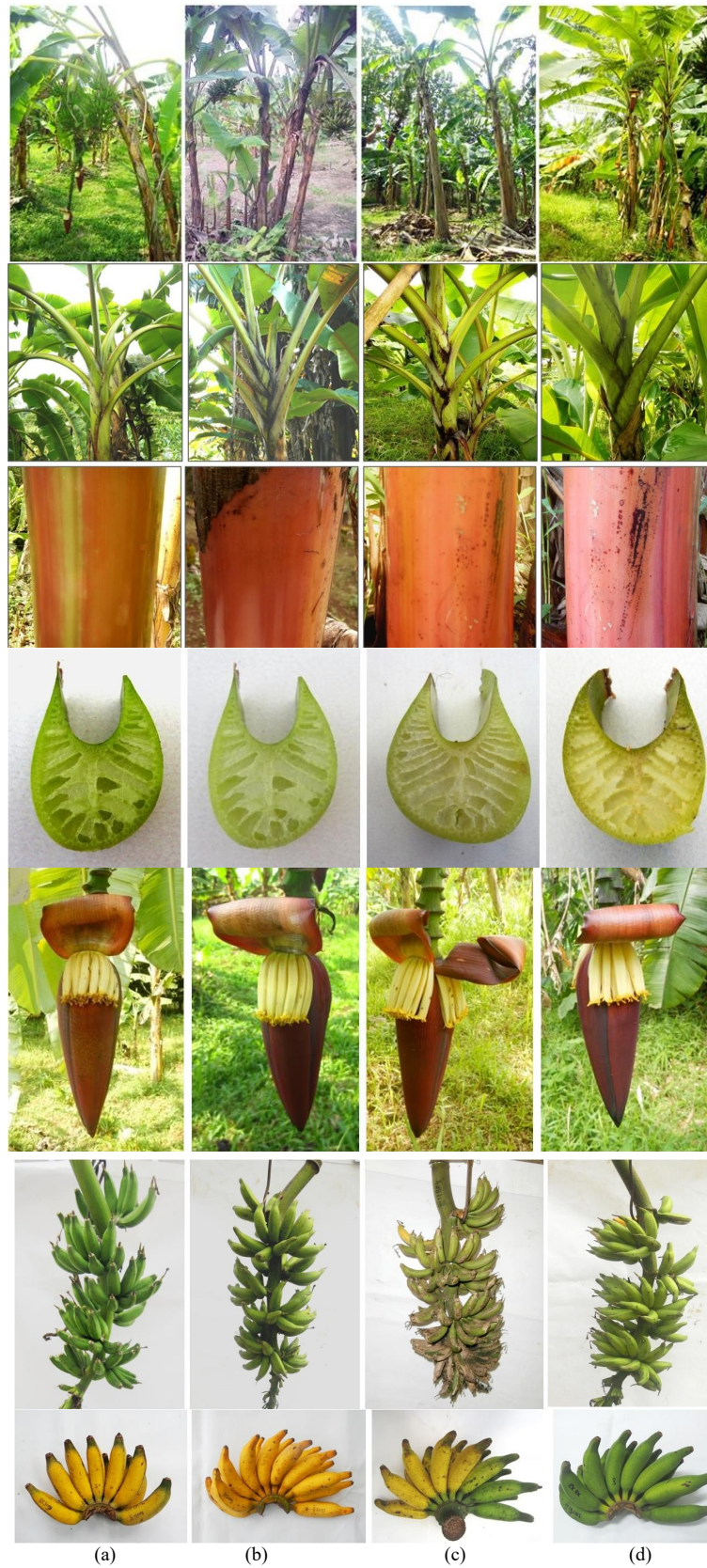
Secara umum, karakter-karakter generatif pisang Rejang hibrid triploid tidak berbeda dengan kedua tetuanya. Pisang Rejang hibrid triploid memiliki lekukan tangkai tandan, bulu pada tangkai tandan, bentuk tandan, susunan buah pada tandan, dan kepadatan tandan, mirip dengan kedua tetuanya. Demikian pula pisang Rejang hibrid triploid memiliki karakter-karakter pada rachis seperti pola pertumbuhan perbungaan jantan, bekas perbungaan, kondisi dan keberadaan braktea, mirip dengan kedua tetuanya. Bentuk *male bud* (jantung) pisang Rejang hibrid triploid tidak berbeda dengan kedua tetuanya, yaitu berbentuk lanset. Braktea akan menggulung sebelum jatuh, seperti kedua tetuanya (Tabel 4, Gambar 2). Demikian pula pisang Rejang hibrid triploid memiliki karakter-karakter panjang dan

diameter tandan, susunan buah, posisi tandan, dan bentuk tandan yang menyerupai kedua tetuanya (Tabel 4, Gambar 2). Perbedaan yang terlihat pada pisang Rejang hibrid triploid adalah karakter bobot tandan, bobot sisir dan bobot buah serta pajang buah, yang melebihi kedua tetuanya (Tabel 4).

**Analisis hibrid pisang dengan marka ISSR**

Identifikasi molekuler hibrid dilakukan dengan menggunakan delapan primer ISSR, yaitu UBC-811, UBC-814, UBC-815, UBC-822, UBC-823, UBC-834, UBC-835, dan UBC-844. Pola pita (profil) DNA hasil amplifikasi dengan delapan primer ISSR menghasilkan profil DNA yang jelas, dapat dibaca dan diskor (Gambar 3). Nilai kesamaan genetik pisang Rejang hibrid triploid dengan aksesori lainnya berkisar antara 0.9174 hingga 0.9703. Secara umum properti genetik pisang Rejang hibrid triploid memiliki kesamaan yang tinggi dengan kedua tetuanya (Tabel 5).

## Pembentukan dan Penampilan Pisang Rejang Hibrid Triploid



**Gambar 2.** Penampilan tanaman: (a) Tetua ♀ Pisang Rejang (mixoploid), (b) Tetua ♂ Pisang Rejang (2x), (c) Pisang Rejang hibrid (3x) dan (d) Pisang Rejang hibrid (2x)

**Tabel 3.** Penampilan karakter vegetatif pisang Rejang hibrid dan kedua tetuanya

Karakter	Tetua betina Rejang mix	Tetua jantan Rejang 2x	RKRK 3x	RKRK 2x
Ploidi/genom	2x-4x/AA-AAAA	2x/AA	3x/AAA	2x/AA
Tanaman/batang semu				
Jumlah anakan	3.15 ± 1.87	12 ± 2.65	3.4 ± 1.14	5.97 ± 1.89
Habitus tanaman	Merunduk	Tegak	Merunduk	Tegak
Tinggi batang semu (cm)	209.54 ± 24.59	195.63 ± 20.11	233.58 ± 26.72	198.89 ± 15.40
Diameter batang semu (cm)	10.82 ± 1.22	9.98 ± 0.36	10.85 ± 0.96	10.60 ± 0.32
Peruncingan batang semu	Tidak ada/ sedikit	Tidak ada/ sedikit	Tidak ada/ sedikit	Tidak ada/ sedikit
Pigmentasi pada batang semu	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang
Warna batang semu bagian dalam	Merah	Merah	Merah	Merah
Kekompakan mahkota	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang
Pola sayap tangkai daun bagian pangkal ( <i>petiole canal</i> )	Lurus	Lurus	Lurus	Lurus
Panjang daun (cm)	163.0 ± 17.40	166.67 ± 11.55	169.0 ± 28.93	167.95 ± 12.81
Lebar daun (cm)	42.5 ± 5.0	41.67 ± 2.89	48.0 ± 5.56	47.0 ± 4.24
Panjang tangkai daun (cm)	35.0 ± 4.08	38.33 ± 7.64	49.50 ± 13.38	35.89 ± 4.40
Rasio panjang/lebar daun	3.84	4	3.52	3.57
Warna tulang ( <i>midrib</i> ) pada daun bagian bawah	Hijau muda RHS138D	Hijau muda	Hijau muda	Hijau muda kekuningan
Lapisan lilin pada daun bagian bawah	Tidak ada/sangat sedikit	Tidak ada/sangat sedikit	Tidak ada/sangat sedikit	Tidak ada/sangat sedikit
Bentuk daun bagian pangkal	Kedua sisi runcing	Kedua sisi runcing	Kedua sisi runcing	Kedua sisi runcing
Kilap pada daun bagian atas	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada

## PEMBAHASAN

### Persilangan pisang Rejang mixoploid dengan Pisang Rejang diploid

Keberhasilan program pemuliaan pisang membutuhkan produksi biji melalui hibridisasi seksual. Hal ini dianggap sebagai masalah yang paling sulit dalam pemuliaan pisang budidaya. Beberapa faktor yang dapat berpengaruh terhadap keberhasilan persilangan antara lain fertilitas serbuk sari, fertilitas sel telur, dan/atau sterilitas serbuk sari atau sel telur yang mengakibatkan produksi biji yang rendah (Stover & Simmonds 1987, Ssebuliba *et al.* 2008). Selain itu, hambatan fisiologi persilangan, kompatibilitas antar kombinasi persilangan juga berpengaruh terhadap keberhasilan persilangan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 14 dari 24 kombinasi persilangan (58.33%) menghasilkan biji hibrid. Pembentukan biji hibrid ini relatif tinggi bila dibandingkan dengan penelitian Ortiz & Crouch (1997) yang menunjukkan hasil persilangan

buatan antara pisang tetraploid dengan diploid berkisar antara 30-88%.

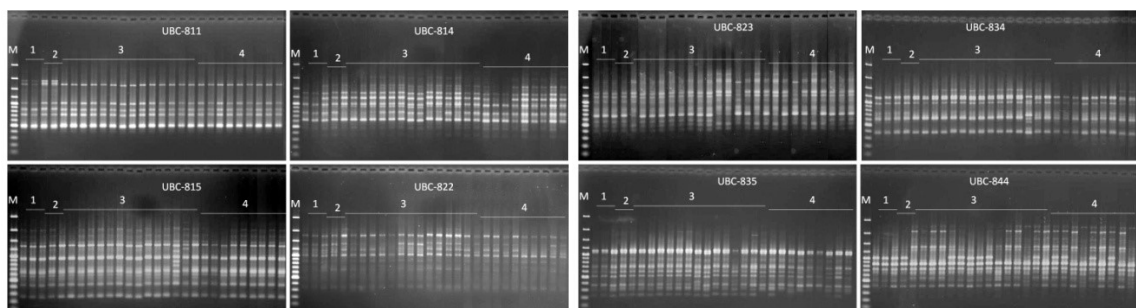
Pada penelitian ini penggunaan pisang Rejang mixoploid sebagai tetua betina dan pisang Rejang diploid sebagai tetua jantan menghasilkan hibrid triploid dengan prosentase yang tinggi yaitu 73.33%. Hasil ini menunjukkan bahwa prosedur persilangan antara betina mixoploid dengan jantan diploid efektif untuk menghasilkan pisang hibrid triploid.

Pada penelitian ini 10 dari 24 kombinasi persilangan tidak menghasilkan biji sama sekali. Semua faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan biji dari persilangan melibatkan genotip dan kondisi lingkungan yang sama dengan kombinasi persilangan lainnya. Penjelasan yang mungkin adalah bervariasinya kemampuan polen pisang Rejang untuk membentuk *pollen tube* yang normal. Karena tidak semua polen pisang Rejang menghasilkan *pollen tube* yang normal. Rendahnya embrio hibrid yang tumbuh dan berkembang menghambat keberhasilan persilangan.



**Tabel 4.** Penampilan karakter generatif pisang Rejang hibrid dan kedua tetuanya

Karakter	Tetua betina Rejang mix	Tetua jantan Rejang 2x	RKRK 3x	RKRK 2x
Panjang tangkai tandan (cm)	35.0 ± 10.0	30.92 ± 1.41	38.00 ± 10.83	36.5 ± 12.02
Diameter tangkai tandan (cm)	3.96 ± 0.84	3.45 ± 0.26	4.53 ± 1.50	4.40 ± 0.52
Rambut/bulu pada tangkai tandan	Ada	Ada	Ada	Ada
Lekukan tangkai tandan (curvature)	Melekuk (sudut	Melekuk (sudut 45°)	Melekuk	Melekuk
Panjang tandan (cm)	54.0 ± 4.18	66.67 ± 12.14	64.0 ± 2.83	58.71 ± 9.56
Diameter tandan (cm)	28.0 ± 2.74	30.34 ± 6.43	33.0 ± 3.40	29.57 ± 9.27
Bentuk tandan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Tidak beraturan
Susunan buah pada tandan	Menekuk ke atas	Menekuk ke atas	Menekuk ke	Menekuk ke atas
Kepadatan tandan	Renggang	Renggang	Renggang	Renggang
Jumlah sisir	6.0 ± 1.58	9.00 ± 1.00	9.00 ± 2.1	8.67 ± 0.58
Jumlah buah	11.8 ± 0.45	13.33 ± 2.08	14.5 ± 2.37	11.33 ± 3.06
Pola pertumbuhan perbungaan jantan pada rachis	Miring	Miring	Miring	Miring
Bekas perbungaan pada rachis	Kurang kuat	Kurang kuat	Kurang kuat	Kurang kuat
Keberadaan braktea pada rachis	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
Keberadaan perbungaan jantan/jantung	Ada	Ada	Ada	Ada
Bentuk jantung	Lanset	Lanset	Lanset	Lanset
Pembukaan braktea	Tertutup	Tertutup	Tertutup	Tertutup
Warna braktea bagian dalam	Merah-ungu	Merah-ungu	Merah-ungu	Merah-ungu
Bentuk braktea bagian ujung	Lebar meruncing	Lebar meruncing	Lebar meruncing	Lebar meruncing
Bobot tandan (kg)	5.15 ± 1.05	5.2 ± 0.88	5.5 ± 0.71	5.3 ± 1.13
Bobot sisir (g) (sisir #3)	520.0 ± 78.74	496.67 ± 76.48	602.5 ± 116.67	565.0 ± 21.21
Bobot buah (g)	42.77 ± 5.17	40.0 ± 1.59	62.4	40.6
Panjang buah (cm)	7.72 ± 1.57	10.26 ± 1.3	10.4 ± 0.49	11.60 ± 3.40
Lebar buah (tanpa kulit buah) (cm)	2.4 ± 0.14	2.65 ± 0.15	2.21	2.4
Panjang tangkai buah (cm)	1.86 ± 0.37	1.75 ± 0.66	1.35 ± 0.35	1.9 ± 0.14
Bentuk ujung buah	Leher botol	Leher botol	Leher botol	Leher botol
Warna kulit buah sebelum masak	Hijau	Hijau	Hijau	Hijau
Warna kulit buah	Kuning	Kuning	Kuning	Kuning
Kelekatan kulit buah	Tidak lekat	Tidak lekat	Tidak lekat	Tidak lekat
Keberadaan organ perbungaan pada buah	Ada	Ada	Ada	Ada
Warna daging buah	Krem	Krem	Krem	Krem
Kekerasan buah	Lunak	Lunak	Lunak	Lunak
Brix (%)	17.42 ± 1.02	16.35 ± 1.48	17.41 ± 1.88	16.50
pH	5.03 ± 0.14	5.11 ± 0.17	4.8 ± 0.25	4.6



**Gambar 3.** Profil pita DNA hibrid pisang RKRK dan tetuanya dengan 8 primer ISSR Keterangan: M = 100 bp plus DNA marker (Fermentas)

**Keterangan** 1 = Tetua ♀ Rejang (I 11A#3, mixoploid), 2 = Tetua ♂ Rejang (2x) (I 11B#4), 3 = Rejang Hibrid (3x), 4 = Rejang Hibrid (2x)

**Tabel 5.** Nilai kesamaan genetik (*genetic identity*) dan jarak genetik (*genetic distance*) pisang Rejang hibrid triploid dan diploid serta kedua tetuanya (Nei 1978)

Populasi	Tetua betina	Tetua jantan	Hibrid	Hibrid RKRK diploid
	Rejang mixoploid	Rejang diploid	RKRK triploid	
Tetua betina	--	0.9505	0.9174	0.921
Rejang mixoploid				
Tetua jantan	0.0508	--	0.9703	0.9389
Rejang diploid				
Hibrid	0.0862	0.0302	--	0.9639
RKRK triploid				
Hibrid RKRK diploid	0.0823	0.0631	0.0368	--

Perkembangan embrio pisang dipengaruhi banyak faktor, diantaranya bentuk dan warna biji, serta bentuk dan warna embrio. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa biji hibrid yang terbentuk terdiri atas biji yang utuh hingga kisut dan berwarna hitam hingga coklat muda. Dari pengamatan bentuk dan warna biji, hanya biji yang utuh dan hitam saja yang memiliki embrio yang dapat tumbuh. Selain itu, media yang optimal untuk perkecambahan biji pisang hibrid hasil silangan perlu diketahui untuk mengecambahkan embrio dengan kebutuhan nutrisi yang terbaik. Pada penelitian ini hanya dua dari 19 embrio yang tumbuh dan berkembang. Pada penelitian ini, media yang digunakan yaitu MS yang ditambah dengan 2 mg/L BA, tidak dapat *nursing* embrio dengan baik. Asif *et al.* (2001) melaporkan bahwa konsentrasi *benzyl amino purine* (BA) secara signifikan mempengaruhi laju perkecambahan embrio pisang liar, *Musa acuminata* var *malaccensis*. Perkecambahan tertinggi diperoleh pada konsentrasi BA 2.2µM, yang tidak berbeda nyata dengan kontrol, dan semakin tinggi konsentrasi BA, perkecambahan semakin menurun. Hal ini perlu diteliti lebih lanjut khususnya mengenai kebutuhan nutrisi dalam media perkecambahan dan perkembangan embrio pisang hibrid.

#### Identifikasi tingkat ploidi hibrid dengan Flowcytometer

Hasil identifikasi tingkat ploidi menunjukkan tanaman hibrid yang diuji menunjukkan 33 tanaman

triploid dan diploid dengan *peak* pada channel 300 dan channel 200 (Gambar 1). Pisang Rejang hibrid triploid memiliki rata-rata kandungan DNA (mean) berkisar antara 261.37 hingga 346.98 dengan coefficient of variation (CV) antara 3.24-10.17 (Tabel 5).

#### Penampilan karakter tanaman pisang Rejang hibrid

Pisang Rejang hibrid (AAA) berasal dari persilangan tetua betina pisang Rejang#2 mixoploid (AA-AAAA) dengan tetua jantan pisang Rejang#2 diploid (AA). Tetua jantan yang digunakan terbukti tahan terhadap serangan penyakit layu Fusarium (Tropical race 4) (Sutanto *et al.* 2014). Penampilan pisang Rejang hibrid triploid tidak berbeda dengan kedua tetuanya, kecuali daya hasil (bobot tandan) melebihi kedua tetuanya, sehingga hibrid ini lebih unggul dari kedua tetuanya.

Secara umum penampilan pisang Rejang hibrid triploid menyerupai tetua betina, Pisang Rejang mixoploid, kecuali tinggi dan diameter batang semu, serta bobot tandan, dan bobor buah lebih besar dari kedua tetuanya. Beberapa penampilan karakter tanaman pisang Rejang hibrid triploid seperti habitus tanaman dan jumlah anakan lebih menyerupai tetua betinanya (Tabel 2). Habitus tanaman hibrid triploid yang merunduk lebih menyerupai tetua betina Pisang Rejang mixoploid dibandingkan dengan tetua jantan Pisang Rejang diploid yang memiliki habitus tegak (Gambar 2.).

Karakter kualitatif hibrid triploid lainnya, pada

umumnya tidak berbeda dengan kedua tetuanya. Hibrid triploid memiliki warna batang semu, bentuk sayap tangkai daun, bentuk pangkal daun bagian kiri dan kanan yang tidak simetris, lapisan lilin pada lembaran daun, warna permukaan daun, bentuk jantung (*male bud*) serta braktea yang menggulung sebelum jatuh, mirip dengan kedua tetuanya (Gambar 2).

Lima karakter kuantitatif hibrid triploid yang meliputi bobot tandan, tinggi tanaman, panjang dan lebar daun, serta diameter batang, menunjukkan ukuran yang lebih besar dari kedua tetuanya (Tabel 2).

### Profil ISSR pisang hibrid'

Hasil analisis kesamaan genetik diantara pisang hibrid dengan kedua tetuanya menunjukkan kesamaan genetik yang relatif tinggi dengan indeks kesamaan antara 0,9174 hingga 0,9703. Secara umum properti genetik hibrid memiliki kesamaan yang tinggi dengan kedua tetuanya.

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa produksi pisang Rejang hibrid triploid dapat dilakukan dengan persilangan Pisang Rejang mixoploid dengan pisang Rejang diploid. Rendahnya embrio yang terkandung dalam biji pisang Rejang hibrid (14,62%) serta rendahnya embrio yang berkembang menjadi tunas perlu mendapat perhatian untuk diteliti lebih lanjut. Tanaman pisang Rejang hibrid triploid memiliki tinggi dan diameter batang semu, bobot tandan dan bobot buah yang lebih besar dari kedua tetuanya. Tanaman pisang Rejang hibrid triploid memiliki profil DNA yang mirip dengan kedua tetuanya dengan indeks kesamaan genetik yang relatif tinggi, yaitu antara 0,9174 hingga 0,9703.

### DAFTAR PUSTAKA

Asif, MJ., C. & OR. Yasmin. 2000. Polyploid induction in a local wild banana (*Musa acuminata* var *malaccensis*). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3 (5):740-743.

Carvalho, JFR., CR. Carvalho, & WC. Otoni. 2005. In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell Tissue Org.* 80

(1):69-75.

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 Jain, S.M. and R Swennen (eds). *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutation*. Science Publishers, Inc, Enfield (NH), USA, Plymouth, UK. 229-244.

Hamil, SD., MK. Smith & WA. Dodd. 1992. In vitro induction of banana autotetraploid by colchicines treatment of micropropagated diploids. *Australian Journal of Botany* 42: 887 -96.

IPGRI-INIBAP/CIRAD. 1996. *Description for Bananas (Musa spp)*. International Plant Genetic Resources Institute. Rome. Italy/ International network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier. France/ Centre de Cooperation Internationale pour le Development. Montpellier. France.

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. *Physiology Plant* 15:473-497.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.

Ortiz, R. & JH. Crouch. 1997. The efficiency of natural and artificial pollinators in plantain (*Musa* spp AAB group) hybridization and seed production. *Annals of Botany* 80:893 -895.

Pio, LAS., M. Pasqual, SDO Silva, HS. Rocha, HM. Magalhães, & JDA. Santos-Serejo. 2014. Inducing and identifying artificially-induced polyploidy in bananas. *African Journal of Biotechnology* 13(37): 3748-3758.

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.
- Poerba, YS., Witjaksono, F. Ahmad, & T. Handayani. 2014. Induksi dan karakterisasi Pisang Mas Lumut Tetraploid. 2014. *Jurnal Biologi Indonesia* 10(2):191-200.
- Rodrigues, FA, JDR Soares, RR. Santos, M. Pasqual & S.O. Silva. 2011. Colchicine and amiprofos-methyl (AMP) in polyploidy induction in banana plant. *African Journal of Biotechnology* 10(62):13476-13481.
- Roux, NS., J. Dolezel & FJ. Zapata-Arias. 1999. Cytochimera dissociation through shoot-tip culture of mixoploids bananas. Dalam: Altman, A *et al.* (eds). *Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21<sup>st</sup> Century*. Kluwer Academic Publishers. 255-258.
- Sebuliba, RN., A. Tenkouano & M. Pillay. 2008. Male fertility and occurrence of  $2n$  gametes in East African Highland bananas (*Musa* spp.). *Euphytica* 164:53-62.
- Stover, RH. & NW. Simmonds. 1987. *Bananas*. Longman Sci & Technical, Essex, England. 3rd Edition.
- Sutanto, A., D. Sukma, C. Hermanto & S. Sudarsono. 2014. Isolation and characterization of resistance gene analogue (RGA) from *Fusarium* resistant banana cultivars. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 26(6): 508-518.
- UPOV – International Union for the Protection of New Varieties of Plants. 2010. *Banana: Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability*. Available at <http://www.upov.int/>
- Vakili, NG. 1967. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. *American Journal of Botany* 54(1): 24-36.
- Witono, JR., T. Konishi & K. Kondo. 2008. DNA polymorphisms analysis of *Alocasia odora* and *A. cucullata* in Ishigaki Island, Japan generated by RAPD and ISSR markers and ITS nrDNA sequence data. *Chromosome Botany* 3(1): 11-18.
- 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/>.