

Karakterisasi Pisang Hibrid Tetraploid ‘GRNK’ Hasil Persilangan Pisang Triploid ‘Goroho’ dengan Pisang Iar Diploid *Musa acuminata* Colla var. *nakaii* Nasution
(Generating Tetraploid hybrid banana ‘GRNK’ by crossing triploid pisang ‘Goroho’ with wild diploid *Musa acuminata* Colla var. *nakaii* Nasution)

Yuyu S. Poerba, Diah Martanti, Tri Handayani & Witjaksono
Pusat Penelitian Biologi – LIPI, Email: yyspoerba@yahoo.com

Memasukkan: Desember 2016, Diterima: Maret 2017

ABSTRACT

The use of tetraploid banana in triploid banana breeding has been conducted through $4x \times 2x$ crossing and/or its reciprocals, $2x \times 4x$ crossing. However, the availability of tetraploid banana is naturally very limited, therefore artificially induced tetraploid banana is needed. The present research is aimed to generate tetraploid banana plants by crossing triploid banana ‘Goroho’ as female parent with wild diploid banana, *Musa acuminata* var. *nakaii* Nasution as male parent, and to characterize the tetraploid hybrid. 94 crossings were made by pollinating stigma of Pisang Goroho with pollen of *M. acuminata* var. *nakaii*. Embryos resulted from hybridization were in vitro rescued and propagated. Hybrid plantlets were then acclimatized in the green house and seedlings were planted in the field for two cycles of banana reproduction. Ploidy identification, morphology and molecular characteristics were also conducted for two cycles of banana reproduction. Results of the experiment showed that 9 hybrid seeds were produced from 94 pollinations. However, only 2 hybrid embryos grew and developed into shoots and from two shoots only one shoot was survived. The one shoot were then in-vitro propagated to produce 21 hybrids planted in the field. After being evaluated for two plant reproductive cycles, all hybrid plants were tetraploids ($2n=4x=44$). The hybrid plants had drooping leaves, bigger fruit diameter compared to both parents, and blunt fruit tip. DNA (RAPD) profiles of tetraploid hybrid showed that 37.5% of the bands were from female parent, 37.5% from male parents, and 25% from both parents. The tetraploid hybrid ‘GRNK’ is expected to be useful in triploid banana breeding in the future.

Key Words: Hybrid banana, tetraploid, Goroho, *Musa acuminata* Colla var. *nakaii* Nasution

ABSTRAK

Pemanfaatan pisang tetraploid dalam pemuliaan pisang triploid telah lama digunakan melalui persilangan pisang tetraploid (tetua betina) dengan pisang diploid (tetua jantan) dan/atau melalui persilangan resiprokalnya, yaitu persilangan pisang diploid (tetua betina) dengan pisang tetraploid (tetua jantan). Namun demikian ketersediaan pisang tetraploid di alam sangat terbatas, sehingga induksi pisang tetraploid secara buatan sangat dibutuhkan. Penelitian ini bertujuan untuk membentuk dan melakukan karakterisasi pisang tetraploid melalui persilangan pisang triploid ‘Goroho’ sebagai tetua betina dengan pisang liar diploid, *Musa acuminata* Colla var. *nakaii*, sebagai tetua jantan. 94 persilangan dilakukan dengan menyerbuki putik Pisang Goroho dengan serbuk sari dari *M. acuminata* Colla var. *nakaii*. Embrio dari biji hasil persilangan diselamatkan dan diperbanyak secara in vitro. Selanjutnya, plantlet hibrid hasil perbanyakan in vitro dibibitkan di rumah kaca dan ditanam di kebun percobaan selama dua siklus reproduksi tanaman pisang. Identifikasi tingkat ploidi, karakterisasi morfologi dan karakterisasi molekuler dilakukan selama dua siklus untuk menjamin keseragaman dan kestabilan hibrid baru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 9 biji hibrid dihasilkan dari 94 penyerbukan. Namun demikian hanya 2 embrio hibrid yang tumbuh dan berkembang menjadi tunas, dan dari dua tunas, hanya satu hidup. Selanjutnya, satu tunas hibrid tersebut diperbanyak secara in vitro untuk menghasilkan 21 hibrid ditanam lapang. Setelah evaluasi selama dua siklus tanaman di lapang, semua tanaman hibrid menunjukkan tingkat ploidi tetraploid ($2n=4x=44$). Tanaman hibrid tetraploid tersebut memiliki pertumbuhan daun merunduk, diameter buah lebih besar dibandingkan dengan kedua tetuanya, serta memiliki ujung buah yang membulat. Profil pita DNA (RAPD) pisang hibrid tetraploid menunjukkan 37,5% pita DNA berasal dari tetua betina dan 37,5% dari tetua jantan dan 25% dari kedua tetuanya. Hibrid tetraploid ‘GRNK’ ini diharapkan berguna dalam program pemuliaan pisang pisang triploid selanjutnya.

Kata Kunci: pisang hibrid, tetraploid, Goroho, *Musa acuminata* Colla var. *nakaii* Nasution

PENDAHULUAN

Pisang merupakan tanaman buah-buahan penting bagi jutaan masyarakat tropis dan subtropis dan berperan penting dalam tatanan sosial dan ekonomi. Produksi pisang dunia tercatat

114 juta ton pada tahun 2014 (FAO 2017) Indonesia menduduki peringkat ke-enam dalam produksi pisang dengan total produksi pada tahun 2015 tercatat 7.299.275 ton (BPS 2017). Hambatan produksi pisang yang utama diantaranya penyakit layu Fusarium (Promusa 2017; Wageningen

University Newsletter 2017). Salah satu strategi untuk mengendalikan penyakit ini adalah pembentukan varietas baru tahan penyakit melalui perbaikan genetik. Namun kendalanya adalah hambatan genetik pada tanaman pisang seperti sterilitas pada beberapa pisang diploid dan triploid, partenokarpik, dan kurangnya pengetahuan mengenai genetika dan penurunan sifat resistensi (Stover & Buddenhagen 1986; Wageningen University Newsletter 2017).

Kebanyakan pisang komersial adalah triploid dan hampir seluruhnya steril, diperbanyak secara vegetatif, buah berkembang secara partenokarpi, dan telah mengalami proses domestikasi yang cukup lama (Simmonds 1962). Pisang komersial seperti kultivar-kultivar dari sub-grup Cavendish, merupakan pisang triploid (AAA) steril, memiliki dasar genetik sempit dan keragamannya tergantung atas mutasi somatik yang dapat diseleksi menjadi kultivar baru (Shepherd 1987; Daniells *et al.* 2001). Akibatnya, kultivar-kultivar dari sub grup Cavendish sangat mudah menderita ketika terjadi epidemi penyakit. Oleh karena perlu dikembangkan varietas baru pisang komersial, yang didasarkan atas keragaman genetik yang luas, dan/atau dikombinasikan/disilangkan dengan varietas pisang yang berbeda dasar genetiknya, sehingga diperoleh hibrid triploid unggul yang merupakan kombinasi dari kedua tetuanya.

Tanaman pisang tetraploid sudah lama digunakan untuk menghasilkan kultivar baru dengan karakter agronomi yang dikehendaki, seperti resistensi terhadap penyakit dan ukuran buah lebih besar dibandingkan dengan tetua diploidnya. Tetraploidi merupakan teknik yang penting dalam perbaikan genetik tanaman pisang (Vakili 1962, 1967; Stover & Buddenhagen 1986, Hamill *et al.* 1992; Van Duren *et al.* 1996, Ganga & Chezhiyan 2002; Bakry *et al.* 2007; Kanchanapoom & Koarapatchaikul 2012; Poerba *et al.* 2012, 2014 2016). Pisang tetraploid jarang ditemukan di alam. Secara buatan, pisang tetraploid dapat diinduksi melalui penggandaan kromosom pisang diploid dengan menggunakan senyawa kimia yang menghambat pembentukan *spindle fiber* seperti kolkisin atau oryzalin (Vakili, 1962, 1967; Stover & Buddenhagen 1986, Hamill *et al.* 1992; Van Duren *et al.* 1996, Ganga & Chezhiyan, 2002; Bakry *et al.*

2007; Kanchanapoom & Koarapatchaikul 2012; Poerba *et al.* 2012, 2014, 2016).

Pembentukan pisang tetraploid dapat juga dilakukan dengan persilangan pisang triploid x diploid (Ortiz & Crouch, 1997; Ortiz 1997; E Silva *et al.* 2001). Produksi tetraploid dari persilangan triploid x diploid sudah sejak lama digunakan dalam pemuliaan pisang tetraploid, khususnya pada kultivar Gros Michel. Tetraploid dari skema persilangan ini dapat ditujukan untuk pemuliaan tahan black & yellow sigatoka, layu Fusarium, nematode, tahan penggerek, tanaman pendek, siklus tanaman pendek dan jumlah sisir yang banyak, ukuran buah yang lebih besar (E Silva *et al.* 2001). Aplikasi metode ini tergantung atas kapasitas produksi biji hibrid setelah penyerbukan, potensi perkecambahan biji serta jumlah tanaman tetraploid yang dihasilkan (Silva *et al.* 2001). Diantara metode hibridisasi lainnya, produksi tetraploid dari kultivar triploid merupakan pendekatan tercepat untuk mendapatkan kultivar baru yang resisten terhadap penyakit utama pada pisang dan dapat diterima oleh konsumen (Silva *et al.* 2001). Teknik produksi pisang tetraploid melalui persilangan tidak memerlukan kemampuan teknik yang tinggi, cukup dengan metoda penyerbukan yang sederhana, lebih murah dan mudah dibandingkan dengan teknik induksi tetraploid dengan perlakuan oryzalin atau kolkisin secara *in vitro* yang rumit dan mahal.

Pisang Goroho merupakan salah satu pisang triploid partenokarpik yang bernilai ekonomi tinggi, terutama di masyarakat Sulawesi Utara, dan mampu menghasilkan biji ketika disilangkan. Pisang Goroho juga memiliki kandungan nutrisi yang cukup tinggi. Dalam setiap 100 gram buah, mengandung energi 126 kkal, kadar air 66.09%, kadar abu 2.38%, protein 0.13%, karbohidrat 29.84%. Dengan demikian Pisang Goroho ini memiliki peluang yang tinggi untuk diperbaiki kualitasnya melalui perbaikan genetik, khususnya dalam ketahanan terhadap penyakit layu Fusarium. Persilangan Pisang Goroho dengan pisang liar tahan penyakit layu Fusarium, *M. acuminata* var *nakaii*, diharapkan akan menghasilkan Pisang Goroho tetraploid yang memiliki ketahanan terhadap penyakit layu Fusarium.

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan hibrid pisang tetraploid baru melalui persilangan tetua betina triploid, Pisang Goroho dengan tetua

diploid pisang liar *Musa acuminata* var *nakaii*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pisang Goroho (AAA) – berasal dari petani pisang di Sanggar Tani Muka Karingan, Panenengkoan, Tosuraya, Ratahan, Kabupaten Minahasa, Sulawesi Utara, digunakan sebagai tetua betina untuk diserbuki dengan serbuk sari dari tetua jantan diploid, pisang liar *Musa acuminata* var. *nakaii* (AA wild). Pisang Goroho memiliki keunggulan sebagai berikut: ukuran tandan dan buah yang lebih besar dibandingkan dengan pisang diploid, tangkai buah tidak mudah rontok, kulit buah tidak menempel pada daging buah, serta cocok untuk diolah menjadi makanan olahan. Dalam setiap 100 gram buah pisang Goroho mengandung 126.66 kkal energi, 66.09% air, 2.38% abu, 0.13% lemak, 1.56% protein, dan 29.84% karbohidrat. Sedangkan nilai brix buah pisang 15.9 ± 1.27 dan pH 4.52 ± 0.15 (hasil analisa proksimat, tidak dipublikasi).

Sedangkan tetua jantan, *Musa acuminata* var. *nakaii* diploid (AA wild) merupakan pisang liar berbiji, memiliki batang dan daun bagian bawah berwarna kemerahan yang berasal dari TN Gede Pangrango (Batu Lempar, Cugenang, Kab. Cianjur) hasil eksplorasi Laboratorium Genetika Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi LIPI.

Sejumlah 94 persilangan dilakukan dengan mengambil serbuk sari dari pisang liar *M. acuminata* var *nakaii* dan menyerbukkannya pada bunga betina Pisang Goroho (IV 6E#I). Penyerbukan dilakukan pada pagi hari jam 8, pada saat putik *receptive* dan serbuk sari matang. Setelah penyerbukan, tandan bunga ditutup dengan jaring halus untuk mencegah penyerbukan silang oleh serangga atau penyerbuk lainnya. Buah hasil persilangan dipanen pada saat buah masak fisiologis, 3 bulan setelah penyerbukan.

Biji hasil persilangan dipisahkan dari buah yang sudah masak penuh dan lunak dan diberi label sesuai persilangannya untuk kultur embrio. Biji yang telah dipilih didisinfestasi dengan larutan Natrium hipoklorit 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 adalah media MS (Murashige & Skoog, 1962) mengandung 30 g l^{-1} gula, 100 mg l^{-1} myo inositol, 4 mg l^{-1} thiamine HCl dengan tambahan 2 mg l^{-1} (Poerba dkk. 2014).

Biak tunas yang telah berhasil diiniasasi dipelihara dan diperbanyak dengan subkultur 1-3 bulan pada medium garam formulasi MS dan dipadatkan dengan 8 g/l agar. Setelah tunas bertumbuh menjadi *plantlet*, selanjutnya diaklimatisasi di rumah kaca. Aklimatisasi dan penanaman pisang dilakukan seperti pada penelitian terdahulu (Poerba dkk. 2014).

Analisa ploidi 21 sampel hibrid, tiga sampel tetua betina, dan tiga sampel tetua jantan menggunakan larutan Cystain UV-ploidy (Partec, Germany) yang berisi *buffer* dan pewarna DNA. Identifikasi tingkat ploidi dilakukan dengan protokol dari Doležel *et al.* (2004) yang dimodifikasi (Poerba dkk. 2014).

Hibrid yang sudah ditanam di lapang diamati pertumbuhan dan perkembangannya. Data-data pertumbuhan dan reproduksi, data morfologi dilakukan sesuai dengan Descriptors for Banana (*Musa* spp.) (IPGRI-INIBAP/CIRAD 1996).

Hibrid hasil persilangan diidentifikasi secara molekuler dengan menggunakan marka Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan metoda CTAB (Delaporta *et al.* 1983) yang sudah dimodifikasi (Poerba dkk. 2012). Analisis RAPD dilakukan dengan metoda Williams *et al.* (1990). Amplifikasi DNA dilakukan dengan Thermal Cycler (Takara) dengan kondisi amplifikasi seperti pada Poerba dkk. (2014).

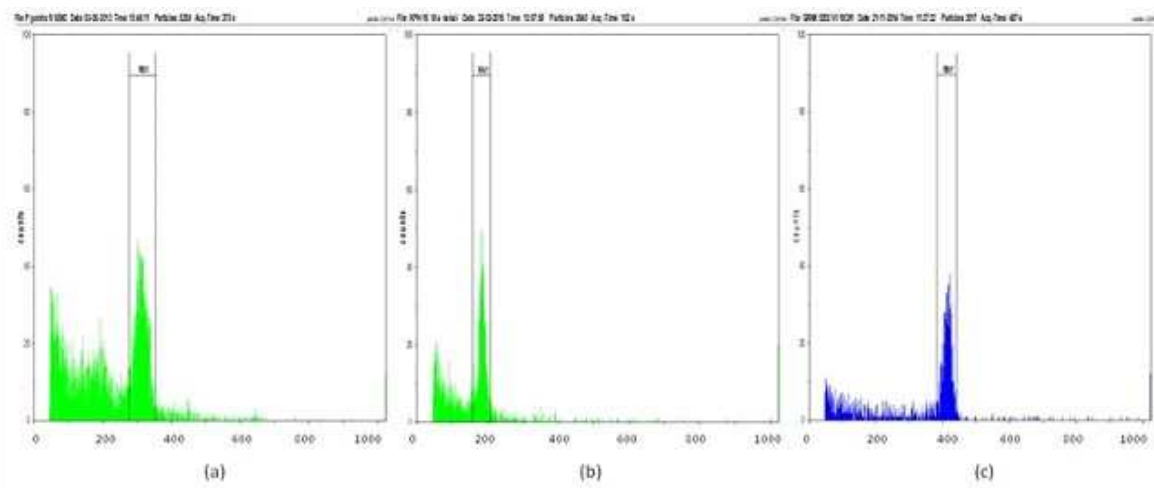
HASIL

Persilangan pisang Goroho dengan *Musa acuminata* var. *nakaii*

Dari 94 persilangan yang dilakukan dihasilkan 9 biji (Tabel 1). Namun demikian, dari 9 biji hibrid pisang hanya 4 (44,44%) saja yang mengandung embrio. Dengan teknik kultur embrio, ke-4 embrio ini kemudian diselamatkan, namun hanya 2 embrio yang tumbuh (1244 GRNK 02 01 dan 1245 GRNK 02 02), selanjutnya hanya satu tunas yang berkembang, yaitu 1245 GRNK 02 02 dan diperbanyak secara *in vitro*, lalu diaklimatisasi

Tabel 1. Jumlah penyerbukan dan biji hibrid yang diperoleh

Tetua ♀: Pisang Goroho			Tetua ♂: <i>M. acuminata</i> var. <i>nakaii</i>					
No Aksesori	No bunga	Ploidi	No Aksesori	Ploidi	∑ x's	∑ Biji	∑ Embrio	∑ Tunas
IV 6E #1	1	3x	PSNAH 11	2x	12			
IV 6E #1	3	3x	PSNAH 11	2x	12			
IV 6E #1	2	3x	PSNAH 20	2x	12	2	2	0
IV 6E #1	3	3x	PSNAH 20	2x	11	5	2	2
IV 6E #1	4	3x	PSNAH 11	2x	12			
IV 6E #1	5	3x	PSNAH 11	2x	12			
IV 6E #1	6	3x	PSNAH 11	2x	12			
IV 6E #1	1	3x	PSNAH 11	2x	11	2	0	
Jumlah					94	9	4	2



Gambar 1. Hasil flowcytometer: (a). Pisang Goroho (tetua betina) yang menunjukkan *peak* pada *channel* 300 (triploid), (b) *Musa acuminata* var. *nakaii* (tetua jantan) yang menunjukkan *peak* pada *channel* 200 (diploid) dan hibrid GRNK yang menunjukkan *peak* pada *channel* 400 (tetraploid)

dan ditanam 21 hibrid GRNK di lapang.

Identifikasi tingkat ploidi hibrid dengan Flow-cytometer

Hasil identifikasi tingkat ploidi menunjukkan semua tanaman hibrid yang diuji (21 tanaman) menunjukkan tanaman tetraploid dengan *peak* pada *channel* 400) (Gambar 1), dengan rata-rata kandungan DNA (mean) hibrid berkisar antara 379,59-456,04 coefficient of variation (CV) antara 2,9-7,17 (Tabel 2).

Penampilan morfologi tanaman pisang hibrid

Dari pengamatan penampilan (*habitus* tanaman), hibrid pisang mempunyai *habitus* merunduk (Gambar 2) yang menunjukkan morfologi

pisang poliploid, yang dicirikan dengan menjuntainya pelepah daun (Poerba *et al.* 2012; Poerba *et al.* 2014). Penampilan tanaman (*habitus* tanaman) yang merunduk ini lebih menyerupai tetua betina Pisang Goroho, dibandingkan dengan tetua jantan diploid *Musa acuminata* var. *nakaii* yang memiliki *habitus* tegak (Gambar 2).

Pseudostem (batang semu) hibrid berbentuk silinder dengan tinggi mencapai 2,20 m, berwarna hijau kekuningan. Warna yang dominan pada bagian bawah *pseudostem* adalah hijau kekuningan dengan warna pigmentasi coklat kemerahan hingga coklat kehitaman (Gambar 3). Getah *pseudostem* seperti air, lebih menyerupai tetua betinanya dibandingkan dengan tetua jantan yang memiliki getah seperti susu (Gambar 3).

Tabel 2. Tingkat ploidi tetua betina dan jantan serta pisang hibrid hasil persilangan

No	No Aksesori	Mean Pisang Goroho (tetua ♀)	CV(%)	Tingkat ploidi
1	IV 6E#1	307,42	8,27	3x
		<i>Musa acuminata var nakaii</i> (tetua ♂)		
1	PSNAH 20	216,87	8,55	2x
		Hibrid Pisang Goroho x <i>Musa acuminata var nakaii</i>		
1	VII 18A#1	418,25	5,99	4x
2	VII 18A#3	395,36	7,06	4x
3	VII 18A#4	424,97	5,82	4x
4	VII 18A#5	410,87	5,66	4x
5	VII 18B#2	418,24	7,17	4x
6	VII 18B#3	443,63	5,85	4x
7	VII 18B#4	413,14	8,70	4x
8	VII 18B#5	412,75	8,50	4x
9	VII 18C#1	413,80	3,03	4x
10	VII 18C#2	421,43	2,94	4x
11	VII 18C#3	425,10	3,19	4x
12	VII 18C#4	412,59	2,89	4x
13	VII 24A#1	454,83	2,44	4x
14	VII 24A#2	456,04	2,64	4x
15	VII 24A#3	417,27	4,58	4x
16	VII 24A#4	422,48	3,29	4x
17	VII 24A#5	416,17	5,27	4x
18	VII 24B#1	425,75	3,21	4x
19	VII 24B#2	442,08	2,90	4x
20	VII 24B#3	387,22	3,88	4x
21	VII 24B#4	379,39	3,37	4x



Gambar 2. Penampilan tanaman pisang hibrid GRNK (kanan) dan kedua tetuanya, Pisang Goroho (kiri) dan *Musa acuminata var nakaii* (tengah)

Permukaan daun bagian atas tanaman hibrid berwarna hijau, permukaan daun bagian bawah berwarna hijau bercampur coklat, merupakan paduan antara tetua betina yang berwarna hijau dan tetua jantan yang berwarna coklat (Gambar 4).

Bagian kiri dan kanan pangkal daun berukuran tidak sama (asimetris) dengan bentuk yang meruncing seperti kedua tetuanya (Gambar 4).

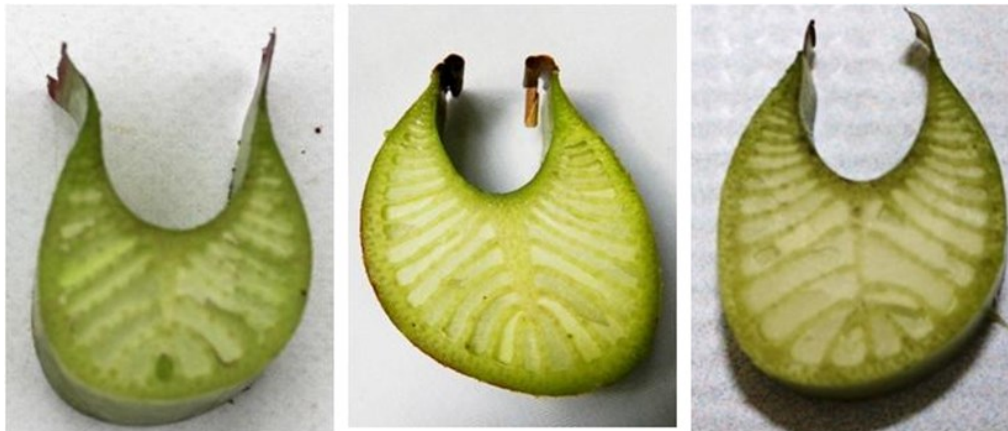
Tipe lekuk tangkai daun (*petiole canal*) pada daun ketiga tanaman hibrid terbuka dengan tepi



Gambar 3. Getah pisang hibrid GRNK (kanan) dan kedua tetuanya, Pisang Goroho (kiri) dan *Musa acuminata* var. *nakaii* (tengah)



Gambar 4. Bentuk daun bagian pangkal pisang hibrid GRNK (kanan) dan kedua tetuanya, Pisang Goroho (kiri) dan *Musa acuminata* var. *nakaii* (tengah)



Gambar 5. Penampang melintang tangkai daun pisang hibrid GRNK (kanan) dan kedua tetuanya, Pisang Goroho (kiri) dan *Musa acuminata* var. *nakaii* (tengah)

tegak, yang lebih menyerupai tetua jantannya, dibandingkan dengan tetua jantan yang memiliki tepi melengkung ke luar (Gambar 5). Bentuk *male bud* (jantung) hibrid menyerupai kedua tetuanya yaitu berbentuk seperti gasing (Gambar 6). Braktea menggulung sebelum jatuh, seperti kedua tetuanya.

Tandan buah tanaman hibrid dengan panjang 30 cm, diameter 33 cm dengan bentuk tandan buah yang tidak beraturan (Gambar 7, 8). Diameter buah lebih besar dari kedua tetuanya dengan bentuk buah lurus dan ujung buah membulat (Gambar 9). Penampilan tanaman dan morfologi

tanaman pisang hibrid dan kedua tetuanya disarikan pada Tabel 3.

Analisis hibrid pisang dengan marka RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Verifikasi hibrid dengan RAPD juga digunakan Grosser *et al.* (2007) dalam verifikasi hibrid somatik pumelo, dan Chundet *et al.* (2007) dalam verifikasi hibrid leci (*Lithcee chinensis* Sonn.). Dengan menggunakan primer OPA-13, pisang hibrid GRNK memiliki 5 pita DNA berukuran dari 700 hingga 1500 bp, sedang

Pisang Goroho memiliki 4 pita DNA yang berukuran dari 700 hingga 1700 bp dan *Musa acuminata* var *nakaii* memiliki 7 pita DNA, yang berukuran dari 450 hingga 1500 bp (Gambar 10). Seperti yang terlihat pada Tabel 4, pada tanaman pisang hibrid terdapat 9 pita DNA spesifik dari pisang Goroho triploid yang tidak terdapat pada *Musa acuminata* var *nakaii*, 5 pita DNA spesifik dari *Musa acuminata* var *nakaii*, dan 9 pita DNA yang berasal dari (dimiliki bersama) kedua tetuanya.

Pada penelitian ini pita DNA pada hibrid

berasal dari tetua betina 37,5%, tetua jantan 37,5% dan kedua tetuanya (25%). Pada penelitian ini, hanya 1 pita DNA dari tetua betina dan 6 pita DNA dari tetua jantan tidak ditemukan pada tanaman hibrid yang diteliti (Gambar 10).

PEMBAHASAN

Keberhasilan program pemuliaan pisang membutuhkan produksi biji melalui hibridisasi seksual. Hal ini dianggap sebagai masalah yang

Tabel 3. Perbandingan karakter morfologi pisang hibrid dengan kedua tetuanya

No	Karakter	Pisang Hibrid GRNK
1	Ploidi (<i>Ploidy</i>)	2n = 4x = 44 (Tetraploid, AAAA)
	Jumlah anakan (<i>Rhizome: number suckers above ground</i>)	Sedang (<i>medium</i>): 5,09 ± 1,81
2	Tinggi batang semu (<i>Pseudostem: length</i>)	Pendek (<i>short</i>): 220,64 ± 30,21
3	Diameter batang (<i>Pseudostem: diameter</i>)	Kecil (<i>small</i>): 11,61 ± 1,58
4	Tumpang tindih pelepah daun (<i>Pseudostem: overlapping of leaf sheaths</i>)	Sedang (<i>medium</i>)
5	<i>Pseudostem: tapering</i>	Sedang (<i>medium</i>)
6	Warna batang semu (<i>Pseudostem: color</i>)	Hijau kemerahan (<i>reddish green</i>)
7	Pewarnaan antosianin (<i>Pseudostem: anthocyanin coloration</i>)	Sedang (<i>medium</i>)
8	Warna pelepah bagian dalam (<i>Pseudostem: color of inner side of basal sheath</i>)	Hijau kekuningan (<i>yellowish green</i>)
9	Kepadatan mahkota (<i>Plant: compactness of crown</i>)	Sedang (<i>medium</i>)
10	Tipe pertumbuhan tanaman (<i>Plant: growth habit</i>)	Merunduk (<i>drooping</i>)
11	Pola sayap pada pangkal daun (<i>Petiole: attitude wings at base</i>)	Lurus (<i>straight</i>)
12	Panjang tangkai daun (<i>Petiole: length</i>)	Pendek (<i>short</i>): 32,38 ± 7,56
13	Warna tulang daun bagian bawah (<i>Leaf blade: color of midrib on lower side</i>)	Hijau keunguan (<i>purple green</i>)
14	Bentuk daun bagian pangkal (<i>Leaf blade: shape of base</i>)	Kedua sisi melancip (<i>both sides acute</i>)
15	Lapisan lilin pada daun bagian bawah (<i>Leaf blade: waxiness on lower side</i>)	Sangat sedikit (<i>weak</i>)
16	Panjang daun (<i>Leaf blade: length</i>)	Pendek (<i>short</i>): 136,38 ± 16,75
17	Lebar daun (<i>leaf blade: width</i>)	Sempit (<i>narrow</i>): 51,08 ± 6,29
18	Rasio panjang/lebar daun (<i>Leaf blade: ratio length/width</i>)	Memanjang (<i>elongated</i>): 2,68 ± 0,30
19	Kilap pada daun bagian atas (<i>Leaf blade: glossiness at upper side</i>)	Tidak ada (<i>absent</i>)
20	Panjang tangkai tandan (<i>Peduncle: length</i>)	Pendek (<i>short</i>): 25,58 ± 3,85
21	Diameter tangkai tandan (<i>Peduncle: diameter</i>)	Kecil (<i>small</i>): 3,30 ± 0,28
22	Bulu pada tangkai tandan (<i>Peduncle: pubescence</i>)	Ada (<i>present</i>)
23	Lekukan tangkai tandan (<i>Peduncle: curvature</i>)	Sedang (<i>medium</i>)
24	Panjang tandan (<i>Bunch: length</i>)	Pendek (<i>short</i>): 29,08 ± 5,02
25	Diameter tandan (<i>Bunch: diameter</i>)	Sedang (<i>Medium</i>): 33,08 ± 5,35
26	Bentuk tandan (<i>Bunch: shape</i>)	Tidak beraturan (<i>irregular</i>)
27	Susunan buah (<i>Bunch: attitude of fruits</i>)	Agak menekuk ke atas (<i>moderately turned up</i>)
28	Kekompakan tandan (<i>Bunch: compactness</i>)	Jarang (<i>loose</i>)
29	Jumlah sisir (<i>Bunch: number of hands</i>)	Sedikit (<i>few</i>): 3,77 ± 1,09
30	Perbungaan jantan (<i>Rachis: attitude of male parts</i>)	Tegak lurus (<i>vertical</i>)

Tabel 3. Perbandingan karakter morfologi pisang hibrid dengan kedua tetuanya

No	Karakter	Pisang Hibrid GRNK
32	Bekas perbungaan (<i>Rachis: prominence of scars</i>)	Kuat (<i>strong</i>)
33	Keberadaan braktea (<i>Rachis: persistence of bracts</i>)	Tidak ada (<i>absent</i>)
34	Keberadaan bunga hermaphrodit (<i>Rachis: persistence of hermaphrodite flowers</i>)	Tidak ada (<i>absent</i>)
35	Lekukan buah (<i>Fruit: curvature</i>)	Lurus (<i>straight</i>)
36	Lekukan longitudinal buah (<i>Fruit: longitudinal ridges</i>)	Tidak ada (<i>absent</i>)
37	Panjang buah (<i>Fruit: length</i>)	Pendek (<i>short</i>): 13,5 ± 1,95
38	Lebar buah (tidak termasuk kulit buah) (<i>Fruit: width excluding ridges</i>)	Sempit (<i>narrow</i>): 3,15 ± 0,24
39	Panjang tangkai buah (<i>Fruit: length of pedicel</i>)	1,16 ± 0,14
40	Bentuk ujung buah (<i>Fruit: shape of apex</i>)	Membulat (<i>rounded</i>)
41	Tebal kulit buah (<i>Fruit: thickness of peel</i>)	Tipis (<i>thin</i>): 0,25 ± 0,02
42	Warna kulit buah sebelum masak (<i>Fruit: color of peel before maturity</i>)	Hijau tua (<i>dark green</i>)
43	Warna kulit buah (<i>Fruit: color of peel</i>)	Hijau (<i>green</i>)
44	Kelekatan kulit buah (<i>Fruit: adherence of peel</i>)	Sedang (<i>medium</i>)
45	Keberadaan organ perbungaan (<i>Fruit: persistence of floral organs</i>)	Ada (<i>present</i>)
46	Warna daging buah (<i>Fruit: color of flesh</i>)	Krem (<i>cream</i>)
47	Kekerasan buah (<i>Fruit: firmness of flesh</i>)	Keras (<i>firm</i>)
48	Keberadaan perbungaan jantan/jantung (<i>Male inflorescence: persistence</i>)	Ada (<i>present</i>)
49	Bentuk jantung (<i>Male inflorescence: shape</i>)	Membundar telur sedang (<i>medium ovate</i>)
50	Pembukaan braktea (<i>Male inflorescence: opening of bracts</i>)	Tertutup (<i>closed</i>)
51	Warna braktea bagian dalam (<i>Bract: color of inner side</i>)	Coklat keunguan (<i>purple brown</i>) (RHS 187A)
52	Bentuk braktea bagian ujung (<i>Bract: shape of apex</i>)	Lancip lebar (<i>broad acute</i>)



Gambar 6. Bentuk jantung pisang hybrid GRNK (kanan) dan kedua tetuanya, Pisang Goroho (kiri) dan *Musa acuminata* var. *nakaii* (tengah)

paling sulit dalam pemuliaan pisang budidaya (E Silva *et al.* 2001; Ortiz 1997; Ortiz & Crouch 1997; Ortiz & Vuylsteke. 1995). Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan persilangan antara lain fertilitas serbuk sari, fertilitas sel telur, dan/atau sterilitas serbuk sari atau sel telur yang mengakibatkan

produksi biji rendah (Stover & Simmonds 1987, Ortiz & Vuylsteke 1995; Sebuliba *et al.* 2008; Ortiz *et al.* 2008). Selain itu, hambatan fisiologi persilangan, kompatibilitas antar kombinasi persilangan juga berpengaruh terhadap keberhasilan persilangan (Stover & Buddenhagen 1986). Pada penelitian ini, produksi biji hibrid hasil



Gambar 7. Penampilan tandan pisang hibrid GRNK (kanan) dan kedua tetuanya, Pisang Goroho (kiri) dan *Musa acuminata* var *nakaii* (tengah)



Gambar 8. Susunan buah pada tandan pisang hibrid GRNK (kanan) dan kedua tetuanya, Pisang Goroho (kiri) dan *Musa acuminata* var. *nakaii* (tengah)

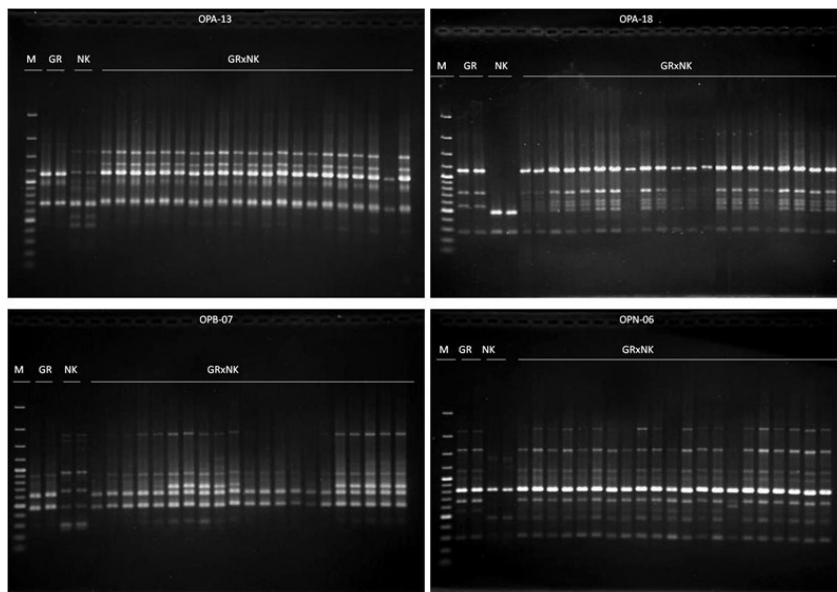
persilangan Pisang Goroho dan *M. acuminata* var. *nakaii*, cukup rendah (9 biji hibrid dari 94 penyerbukan). Kemungkinan adalah fertilitas betina yang rendah, karena fertilitas serbuk sari cukup tinggi. Peran tetua jantan, pisang liar, memiliki serbuksari dengan jumlah besar dan relatif tinggi daya kecambahnya, serta viabilitas yang relatif tinggi juga harus disertai dengan fertilitas betina.

Menurut Simmonds (1962) dan Stover and Simmonds (1987), kebanyakan pisang steril disebabkan oleh gen sterilitas betina, triploidi, dan perubahan struktur kromosom. Hal ini juga tergantung pada klon yang digunakan. Perkembangan biji pada pisang budidaya tidak hanya tergantung pada kondisi maternal tetapi juga ketersediaan polen. Stover & Simmonds (1987) menunjukkan bahwa

produksi biji pada Cavendish tidak dihasilkan setelah ribuan penyerbukan dilakukan. Kebalikannya, 'Gros Michel' dapat menghasilkan satu atau dua biji per tandan jika diserbuki atau ditanam dekat sumber polen. Stover & Buddenhagen (1986) juga melaporkan bahwa kultivar-kultivar Cavendish yang disilangkan dengan tetua jantan diploid yang fertile tidak pernah menghasilkan biji. Demikian juga persilangan dengan kultivar 'Valery' (Cavendish) tidak berhasil membentuk biji. Tetapi ada juga kekecualian, diantaranya adalah ketika kultivar "Valery" disilangkan dengan pisang liar *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* tahun 1964, yang menghasilkan hibrid diploid yang kerdil, yang kemudian digunakan dalam pemuliaan diploid kerdil (Stover & Buddenhagen 1986). Kekecualian



Gambar 9. Penampilan buah buah pisang hibrid GRNK (kanan) dan kedua tetuanya: Pisang Goroho (kiri) dan *Musa acuminata* var. *nakaii* (tengah)



Gambar 10. Profil pita DNA hibrid pisang GRNK dan kedua tetuanya (Goroho dan *Musa acuminata* var. *nakaii*) dengan primer OPA-13, OPA-18, OPB-07 dan OPN-07.

Keterangan: M = 100 DNA ladder plus (Fermentas), GR = Pisang Goroho (4x), NK = *Musa acuminata* var. *nakaii* (2x), GRxNK = Hibrid GRNK

kedua adalah pada tahun 1990, persilangan antara tetua betina ‘Williams’ dengan tetua jantan diploid ‘SH-3142’ yang menghasilkan satu biji hibrid tetraploid yang dikenal dengan pisang tetraploid ‘FHIA-02’ (Morán 2013). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pembentukan biji hibrid pada persilangan ini relatif lebih tinggi daripada produksi biji pada

pisang Cavendish, dan menegaskan bahwa fertilitas betina pada Pisang Goroho lebih tinggi dibandingkan dengan Pisang Cavendish. Hal ini juga menunjukkan bahwa Pisang Goroho memiliki peluang yang lebih besar untuk dapat diperbaiki secara genetik dibandingkan Pisang Cavendish.

Tingkat/derajat fertilitas betina dari kultivar

-kultivar triploid, tergantung atas faktor-faktor biotik dan abiotik, untuk Cavendish kira-kira satu biji untuk setiap 100 tandan yang diserbuki. Pengembangan hibrid tetraploid dengan tiga set kromosom dari betina Cavendish dan satu set kromosom dari tetua jantan merupakan dasar untuk membentuk hibrid triploid mirip Cavendish generasi kedua (Morán 2013). Pada penelitian ini fertilitas betina pisang triploid Goroho relatif tinggi (9 biji dari 94 penyerbukan). Kemungkinan faktor abiotik seperti kondisi lingkungan (cahaya, kelembaban dan suhu) ketika penyerbukan dilakukan mendukung proses persilangan dan pembentukan biji fertilitas Pisang Goroho. Selain harus memiliki fertilitas polen tinggi, tetua jantan biasanya digunakan sebagai sumber ketahanan hama/penyakit (Ortiz *et al.* 1998). Pisang liar memiliki fertilitas polen dan viabilitas polen lebih tinggi dibandingkan dengan pisang domestikasi/budidaya (Ortiz *et al.* 1998), dan biasanya memiliki sumber ketahanan terhadap penyakit sangat menguntungkan digunakan sebagai tetua jantan (Ortiz *et al.* 1998). Dalam penelitiannya, Ortiz *et al.* (1998) menunjukkan bahwa pisang diploid liar, 'Calcutta 4' (*Musa acuminata ssp. burmacoides*) memiliki viabilitas dan fertilitas polen yang lebih tinggi dibandingkan dengan pisang diploid domestikasi ('Pisang Lilin', 'Galeo') dan pisang hibrid diploid *banana-plantain* ('TMP2x 1297-3'). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pisang liar, *M. acuminata* var. *nakaii*, memiliki jumlah polen, viabilitas polen dan tingkat perkecambahan yang lebih tinggi dari pada pisang budidaya, Pisang Madu (data tidak dipublikasikan). Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya pada pisang-pisang liar dan pisang budidaya (Leksonowati *et al.* 2009).

Hasil penelitian ini menunjukkan ini bahwa 9,57% penyerbukan menghasilkan biji. Rendahnya embrio hibrid yang tumbuh dan berkembang menghambat keberhasilan persilangan. Perkembangan embrio pisang dipengaruhi banyak faktor, diantaranya bentuk dan warna biji, serta bentuk dan warna embrio. (Poerba *et al.* 2016). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa biji hibrid yang terbentuk terdiri atas biji utuh hingga kisut dan berwarna hitam hingga coklat muda (data tidak ditampilkan). Dari pengamatan bentuk dan warna biji, hanya biji yang utuh dan hitam saja yang memiliki embrio yang dapat tumbuh (data tidak ditampilkan). 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 satu dari 9 embrio yang tumbuh dan berkembang. Pada penelitian ini, media yang digunakan yaitu MS yang ditambah dengan 2 mg/L BA, tidak dapat memberi nutrisi pada embrio dengan baik, sehingga pertumbuhan embrio tidak optimal. 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 0.5 mg/L, yang tidak berbeda nyata dengan kontrol (tanpa BA), dan semakin tinggi konsentrasi BA, perkecambahan semakin menurun. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perkecambahan embrio hibrid GRNK yang optimal perlu diteliti lebih lanjut.

Penampilan hibrid pisang merupakan gabungan dari kedua tetuanya. Beberapa penampilan morfologi tanaman hibrid seperti habitus tanaman, warna batang semu dan getah batang semu, serta tipe tangkai daun lebih menyerupai tetua betinanya. Habitus tanaman hibrid yang merunduk (Gambar 2) lebih menyerupai tetua betina Pisang Goroho triploid (Gambar 1), dibandingkan dengan tetua jantan diploid *Musa acuminata* var. *nakaii* yang memiliki habitus tegak (Gambar 2). Getah *pseudostem* cair seperti air, lebih menyerupai tetua betinanya dibandingkan dengan tetua jantan yang memiliki getah putih seperti susu (Gambar 3). Beberapa karakter morfologi lainnya pada tanaman hibrid, warna permukaan daun bagian bawah, bentuk jantung (*male bud*) serta braktea yang menggulung sebelum jatuh merupakan gabungan (intermediate) dari kedua tetuanya. Sedangkan pangkal daun bagian kiri dan kanan yang berukuran tidak simetris menyerupai kedua tetuanya (Gambar 4). Hasil penelitian yang serupa juga terlihat pada persilangan Pisang Madu dengan pisang liar, *Musa acuminata* var. *malaccensis* (Poerba *et al.* 2012; Poerba *et al.* 2016).

Pada penelitian ini karakter morfologi hibrid tetraploid memiliki kesamaan yang lebih tinggi dengan tetua jantannya. Tetua triploid menyumbang 1 hingga 3 set kromosom karena ketidakmampuan dalam melakukan meiosis secara normal, sehingga hibrid hasil persilangan

3x x 2x memiliki ploidi diploid, triploid atau tetraploid (Vuylsteke *et al.* 1993). Kultivar triploid dengan fertilitas betina rendah dapat menghasilkan embrio dan hibrid dengan jumlah kromosom 22 dan 33 karena meiosis tidak seimbang (*embryonic sacs* dengan 11-22 kromosom, dan 11 kromosom dari polen haploid), juga dapat menghasilkan embrio dan hibrid dengan jumlah kromosom 44 (33 + 11) (Silva *et al.* 2001). Analisis sitogenetik pada beberapa klon pisang triploid menunjukkan bahwa supresi pada pembelahan meiosis pertama mengakibatkan terbentuknya gamet triploid yang bergabung dengan gamet haploid dari tetua jantan menghasilkan genotipe tetraploid pada persilangan 3x x 2x. Perilaku sitologis ini sesuai dengan proses evolusi pada pisang (Silva *et al.* 2001). Pada setiap persilangan 3x x 2x, polen menyumbang hanya ¼ pada genotip/hibrid baru. Jadi, pada dasarnya, skema ini (persilangan 3x x 2x) merupakan proses implantasi penambahan karakteristik tanpa menyebabkan perubahan representatif lainnya. Oleh karena itu, hibrid tetraploid selalu membawa karakter tetua betina (Silva *et al.* 2001), seperti yang terjadi pada penelitian ini.

Hasil analisis RAPD menunjukkan bahwa hibrid dan kedua tetuanya memiliki polimorfisme cukup tinggi. Perbedaan marka pita pada tetua dan keturunannya dapat disebabkan oleh hasil rekombinasi DNA, mutasi atau segregasi random kromosom saat meiosis selama proses hibridisasi (Huchett & Botha 1995). Hibrid tetraploid 'GRNK' ini memiliki properti genetik gabungan dari kedua tetuanya, dengan profil RAPD yang terdiri atas 37,5% pita DNA unik berasal dari tetua betina, 37,5% pita DNA unik dari tetua jantan dan 25% pita DNA yang berasal (dimiliki bersama) dari kedua tetuanya.

KESIMPULAN

Biji pisang hibrid tetraploid 'GRNK' dapat dihasilkan dari hasil persilangan Pisang Goroho triploid dengan pisang liar diploid *Musa acuminata* var *nakaii* dengan frekuensi 9,57% (9 biji dari 94 penyerbukan). Namun demikian hanya 4 yang mengandung embrio dan hanya 2 embrio hibrid yang tumbuh menjadi tunas, dan dari dua tunas, hanya satu yang bertahan hidup. Selanjutnya dari satu tunas hibrid tersebut diperbanyak

secara in vitro sehingga ditanam 21 hibrid di lapang. Hasil evaluasi selama dua siklus tanaman di lapang, semua tanaman hibrid menunjukkan tingkat ploidi tetraploid ($2n=4x=44$). Tanaman hibrid tetraploid tersebut memiliki pertumbuhan daun merunduk, diameter buah lebih besar dibandingkan dengan kedua tetuanya, serta memiliki ujung buah yang membulat yang berbeda dengan kedua tetuanya. Profil pita DNA (RAPD) pisang hibrid tetraploid menunjukkan 37,5% pita DNA berasal dari tetua betina dan 37,5% dari tetua jantan dan 25% dari kedua tetuanya. Diharapkan pisang hibrid tetraploid hasil penelitian ini akan berguna dalam program pemuliaan pisang triploid selanjutnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Pusat Penelitian Biologi LIPI melalui Program Kompetitif tahun 2010-2012 dengan judul kegiatan "Eksplorasi dan pemanfaatan *Musa acuminata* liar sebagai tetua jantan dalam pemuliaan pisang triploid tahan Fusarium" dan Program Kompetitif tahun 2013-2015 dengan judul kegiatan "Evaluasi, karakterisasi dan seleksi varietas baru pisang hasil induksi poliploidi dan persilangan".

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada K. Utami Nugraheni SP, Herlina, Dian Mulyana yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Asif, MJ., C. Mak & RY. Othman. 2001. In vitro zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 267. doi:10.1023/A:1012781531641
- Bakry, F., NP. 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* 62:3-12.
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2017. <https://www.bps.go.id/site/resultTab6>, diunduh tanggal 5 April 2016).
- Chundet, R., Cutler RW, Tasanon M., &

- Anuntalabhochai S. 2007. Hibrid detection in Lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers. *ScienceAsia* 33:307-311. Available on line at http://www.scienceasia.org/2007.33.n3/v33_307_311.pdf
- Daniells, J., C. Jenny, D. Karamura, K. Tomekpe. 2001. Williams, cultivated varieties AAA. Dalam: Sharrock S (ed) *Musalogue: a catalogue of Musa germplasm – diversity in the genus Musa*. INIBAP, Montpellier, p 76
- Delaporta, SL., J. Wood, & JB. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- 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 & R Swennen (eds). *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutation*. Science Publishers, Inc, Enfield (NH), USA, Plymouth, UK. p 229-244.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2017. Production <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, diunduh tanggal 5 April 2017).
- Ganga, M., & N. Chezhiyan. 2002. Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa spp.*). *Journal Horticulture Science Biotechnol* 77:572–575.
- Grosser, JW., JL. Chandler & LW. Duncan. 2007. Production of mandarin + pummelo somatic hibryd citrus rootstocks with potential for improved tolerance/ resistance to sting nematode. *Sci. Horticult.*, doi: 10.1016/j.scienta.2007.01.033. Available online at <http://hnavl.hzau.edu.cn/kech/ssyy/qysd/njnl/22.pdf>
- Hamill, SD., MK. Smith, & WA. Dodd. 1992. In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Australian Journal of Botany* 40:887–896
- Huchett, BI. & FC. Botha. 1995. Stability and potential use of RAPD markers in a sugarcane genealogy. *Euphytica* 86:117-25.
- 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 Developpement. 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.
- Leksonowati, A, YS Poerba & Witjaksono. 2009. Karakterisasi dan perkecambahan polen pisang *Musa acuminata* komersial dan liar. Dalam Prosiding Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres Perhimpunan Biologi Indonesia XIV. UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang. Hal. 90-98.
- Morán, JFA. 2013. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) La Lima Honduras. Dalam I. Van den Bergh et al. (Eds.). Proc. Int. ISHS-ProMusa Symp. on Bananas and Plantains: Towards Sustainable Global Production and Improved Uses. Acta Hort. 986.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Ortiz, R. 1997. Secondary polyploids, heterosis, and evolutionary crop breeding for further improvement of the plantain and banana genome. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 1113-1120.
- 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.
- Ortiz, R. & D. Vuylsteke. 1995. Factors influencing seed set in triploid *Musa spp.*L. and production of euploid hibrids. *Annals of Botany* 75: 151-155.
- Ortiz, R., DR. Vuylsteke, HK Crouch, & JH Crouch. 1998. TMP3x: triploid black sigatoka resistant *Musa* hybrid germplasm. *HortScience* 33:362-365.
- Ortiz, R., F. Ulburgh, & JU. Okoro. 2008.

- Seasonal variation of apparent male fertility and 2n pollen production in plantain and banana. *Hort Science* 33(1):146-148.
- 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. *Jurnal Biologi Indonesia* 10(2):191-200.
- Poerba, YS., Witjaksono & T. Handayani. 2016. Pembentukan dan penampilan Pisang Rejang Hibrid Triploid hasil persilangan Pisang Rejang Mixoploid dengan Pisang Rejang Diploid. *Jurnal Biologi Indonesia* 12(1):19-30 .
- Promusa. 2017. [http://www.promusa.org/Fusarium + wilt](http://www.promusa.org/Fusarium+wilt) diunduh 5 April 2017;
- 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.
- Shepherd, K. 1987. Banana breeding - past and present. *Acta Horticulturae* 196: 37-43.
- Silva, ESDO., MTS. Junior, EJ. Alves, J. Raimundo, S. Silveira, & MB. Lima. 2001. Banana breeding program at Embrapa. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1 (4): 399-436.
- Simmonds, NW. 1962. Evolution of the bananas. Longmans Tropical Science Series, London.
- Stover, RH. & IW. Buddenhagen. 1986. Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41:175-191.
- Stover, RH. & NW. Simmonds. 1987. Bananas. Longman Sci & Technical, Essex, England. 3rd Edition.
- Vakili, NG. 1967. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. *American Journal of Botany* 54: 34-36.
- Vakili, NG. 1962. Colchicine-induced polyploidy in *Musa*. *Nature* 194: 453-454.
- Van Duren M., R. Morpurgo, J. Dolezel & R. Afza. 1996. Induction and Verification of Autotetraploids in Diploid Banana (*Musa acuminata*) by In Virto Techniques, *Euphytica* 88: 25-34.
- Vuylsteke DR., RL. Swennen RL, R. Ortiz. 1993. Development and performance of black sigatoka-resistant tetraploid hybrids of plantain (*Musa* spp., AAB group). *Euphytica* 65: 33-42.
- Wageningen University Newsletter. 2017. Panama Disease <http://panamadisease.org/>, diunduh tanggal 5 April 2017).
- Williams, JG., AR. Kubelik, KJ. Livak, JA. Rafalsky & SV. Tingev. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18(22): 6531-6535.