

**ANALISA KESTABILAN GENETIK PISANG KEPOK ‘UNTI SAYANG’ HASIL  
MIKROPROGASI DENGAN MARKA RAPD DAN ISSR\*  
[Genetic Stability Analyses of Micropropagated Pisang Kepok ‘Unti Sayang’  
by RAPD and ISSR Markers]**

Yuyu Suryasari Poerba<sup>1✉</sup>, Maria Imelda<sup>2</sup> dan Diyah Martanti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Biologi LIPI; <sup>2</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI  
Jln Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong 16911;  
e-mail: yyspoerba@yahoo.com

**ABSTRACT**

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers were used to evaluate the genetic stability of micropropagated plants of ‘Pisang Kepok Unti Sayang’ at various stage of *in vitro* sub-cultures and *in vivo* plant material. All RAPD and ISSR profiles from micropropagated plants were monomorphic and similar to those of field grown control plants until stage tenth of sub-cultures (V<sub>1</sub>S<sub>10</sub>). No variation was detected within the micropropagated plants, except for C12 (V<sub>1</sub>S<sub>4</sub>), G7 (V<sub>1</sub>S<sub>4</sub>), I11 and I12 (V<sub>1</sub>S<sub>10</sub>). RAPD and ISSR marker were both could be used to test the genetic stability of micropropagated bananas using the developed protocol.

**Key words:** RAPD, ISSR, genetic stability, pisang kepok ‘Unti Sayang’

**ABSTRAK**

Marka Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) dan Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) digunakan untuk mengevaluasi stabilitas genetik tanaman ‘Pisang Kepok Unti Sayang’ hasil mikropropagasi pada berbagai tahap sub-kultur *in vitro* dan *in vivo*. Semua profil RAPD dan ISSR dari tanaman hasil mikropropagasi menunjukkan monomorfik dan sama dengan tanaman kontrol yang ditanam di lapang hingga tahap sub kultur 10 (V<sub>1</sub>S<sub>10</sub>). Tidak ada variasi yang ditemukan diantara tanaman hasil mikropropagasi, kecuali pada sampel C12 (V<sub>1</sub>S<sub>4</sub>), G7 (V<sub>1</sub>S<sub>4</sub>), I11 dan I12 (V<sub>1</sub>S<sub>10</sub>). Kedua marka RAPD dan ISSR dapat digunakan untuk menguji stabilitas genetik pisang hasil mikropropagasi dengan protokol yang sudah dikembangkan.

**Kata kunci:** RAPD, ISSR, stabilitas genetik, pisang kepok ‘Unti Sayang’

**PENDAHULUAN**

Pisang merupakan tanaman buah penting di Indonesia. Tanaman pisang secara luas telah dibudidayakan oleh petani baik di pekarangan ataupun di kebun. Di antara pisang olahan, pisang kepok ‘Unti Sayang’ (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*, ABB) yang dibudidaya di daerah Sulawesi Selatan memiliki nilai ekonomis yang tinggi karena selain rasanya enak, manis (kadar gula mencapai 300 briks) juga sulit di diserang layu bakteri (disebabkan *Ralstonia (Pseudomonas solanacearum)* dan penyakit darah (*bacterial blood disease*) karena pisang itu mempunyai pertahanan alami yaitu tidak punya jantung (bunga jantan) sehingga luput dari kunjungan serangga vektor kedua penyakit itu.

Salah satu strategi untuk memutus rantai penyebaran penyakit tersebut dengan mengembangkan pisang kepok ‘Unti Sayang’. Dengan menggunakan sistem kultur jaringan, pisang kepok ‘Unti Sayang’ dapat diperbanyak secara

massal untuk ditanam dan kembangkan di seluruh Indonesia. Dengan pendekatan ini diperlukan teknik kultur jaringan pisang yang efektif dan efisien untuk produksi massal pisang kepok ‘Unti Sayang’, yang menjamin kestabilan genetik pisang kepok sampai batas tertentu. Kultur jaringan pisang banyak dilaporkan dengan menggunakan berbagai sumber eksplan maupun *pathway* (Bhagyalakshmi dan Singh, 1995; Escalant *et al.*, 1994; Israeli *et al.*, 1995; Harirah dan Khalid, 2006; Krikorian *et al.*, 1993; Novak *et al.*, 1989). Beberapa hormon eksogen dan zat pengatur tumbuh telah dilaporkan berguna untuk mikropropagasi pisang (Bhagyalakshmi dan Singh, 1995; Novak *et al.*, 1989) dimana tingkat sub dan supra optimal zat pengatur tumbuh, khususnya yang sintesis, telah dihubungkan dengan variasi somaklonal (Martin *et al.*, 2006).

Protokol kultur jaringan pisang kepok ‘Unti Sayang’ sudah dikembangkan oleh Imelda (2010).

Namun demikian, pengujian stabilitas genetik protokol ini belum dilakukan. Berbagai teknik molekuler dapat dilakukan untuk mengkaji kestabilan genetik klon pisang yang berasal dari perbanyakan *in vitro* dengan berbagai kelebihan dan keterbatasannya (El-Doug Doug *et al.*, 2007; Lakshmanan *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2006; Sahijram *et al.*, 2003). Hingga saat ini marka Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) dan Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) telah berhasil digunakan dalam mendeteksi kesamaan dan ketidaksamaan genetik dalam tanaman pisang hasil kultur *in vitro* (Lakshmanan *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2001; Ray *et al.*, 2006; Sahijram *et al.*, 2003, Venkatachalam *et al.*, 2007).

Pisang (*Musa spp.*) merupakan salah satu buah-buahan penting di Indonesia. Kebanyakan pisang yang dapat dimakan berasal dari persilangan antara dua jenis diploid liar, *Musa acuminata* Colla (genom A) dan *M. balbisiana* Colla (genom B) (Simmonds dan Shepperd, 1955). Oleh karena itu, varietas budidaya pisang yang merupakan kombinasi dari genom yang berlainan dapat membentuk diploid AA, AB, triploid AAA, AAB, ABB, dan tetraploid AAAA, AAAB dan ABBB, tergantung atas kelipatan kromosom dasar yang jumlahnya 11.

Penelitian ini bertujuan untuk memonitor kestabilan genetik hasil kultur jaringan pisang kepok 'Unti Sayang' yang telah dikembangkan dengan menggunakan marka RAPD dan ISSR hingga subkultur ke 10.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan

Klon pisang kepok 'Unti Sayang' yang dikoleksi dari Nusantara Tropical Fruit digunakan sebagai tanaman induk/tetua. Rizoma digunakan sebagai bahan eksplan dan diinisiasi untuk kultur tunas dan perbanyakan pisang kepok 'Unti Sayang', menurut protokol yang dikembangkan oleh Imelda *et al.* (*unpublished*). Bahan yang digunakan dalam analisis DNA ada dua kelompok. Pertama 12 sampel daun dari tanaman pisang hasil mikropropagasi *in vitro* dari subkultur 1-3 yang sudah ditanam di pem-

bibitan dan yang menunjukkan morfologi daun/tanaman yang berbeda dengan kontrolnya.. Kedua, 51 sampel daun dari tanaman pisang hasil mikropropagasi *in vitro* dari subkultur 2-10 yang sudah ditanam di pembibitan dan yang menunjukkan morfologi daun/tanaman yang berbeda dengan kontrolnya. Semua material DNA berupa potongan daun muda yang dikeringkan dengan silika gel, sesuai dengan pedoman pengambilan sampel untuk material DNA (Widjaya dan Poerba, 2004).

### Ekstraksi dan isolasi DNA

DNA pisang kepok 'Unti Sayang' diekstrak dari daun yang telah dikeringkan dengan silika gel dari tanaman induk/tetua dan dari tanaman hasil mikropropagasi dengan metoda CTAB (Delaporta *et al.*, 1983) yang dimodifikasi dengan penambahan RNase dengan konsentrasi 250 µg/mL.

### Amplifikasi DNA

Tiga primer RAPD (Operon Technologies Inc., Alameda, California) dan dua primer ISSR (UBC) yang digunakan sebelumnya pada pisang (Poerba dan Ahmad, 2010) digunakan dalam polymerase chain reaction (PCR), dengan mengikuti protokol dari Williams *et al.* (1990). Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dengan volume 15 µl yang terdiri atas 0,2 nM dNTPs; 1,5 ml bufer reaksi; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 10 ng DNA sample; 5 pmole primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega). Amplifikasi DNA dilakukan pada Thermalcycler (Takara Gradient PCR) yang diprogram selama 45 siklus Kondisi PCR untuk RAPD adalah sebagai berikut: pemanasan pertama pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas denaturasi 1 menit pada suhu 94°C, annealing 1 menit pada suhu 36°C, dan 2 menit ekstensi pada suhu 72°C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti 4 menit proses ekstensi fragmen DNA pada suhu 72°C. Sedangkan kondisi PCR untuk ISSR adalah pre-denaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan pada suhu 50°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 2 menit' dan

pemanjangan akhir 72°C selama 5 menit. Siklus denaturasi, penempelan dan pemanjangan diulang sebanyak 45 kali dan setelah selesai dijaga dengan suhu 4°C.

Hasil amplifikasi PCR divisualisasi pada gel agarosa 2,0% dalam bufer TEA (Tris-EDTA) secara elektroforesis 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 diGambar dengan menggunakan kamera polaroid. Sebagai standar ukuran DNA digunakan 100 bp DNA ladder (Promega) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

#### Analisis Data

Karena RAPD dan ISSR merupakan marka yang dominan, maka setiap pita RAPD dianggap sebagai satu lokus putatif bialel (*single biallelic locus*) (Williams *et al.*, 1990). Hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk skoring: ada (1) dan kosong (0). Evaluasi pola pita DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan Indeks Kesamaan (*Similarity Index*). Indeks kesamaan

antara sampel dihitung dengan menggunakan rumus dari Nei dan Li (1979):

$$SI = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}, \text{ dimama}$$

SI = Similarity Index (Indeks Kesamaan)

$N_{ij}$  = jumlah pita DNA yang sama-sama dimiliki oleh genotipe i dan j

$N_i$  = jumlah pita DNA yang dimiliki genotipe i

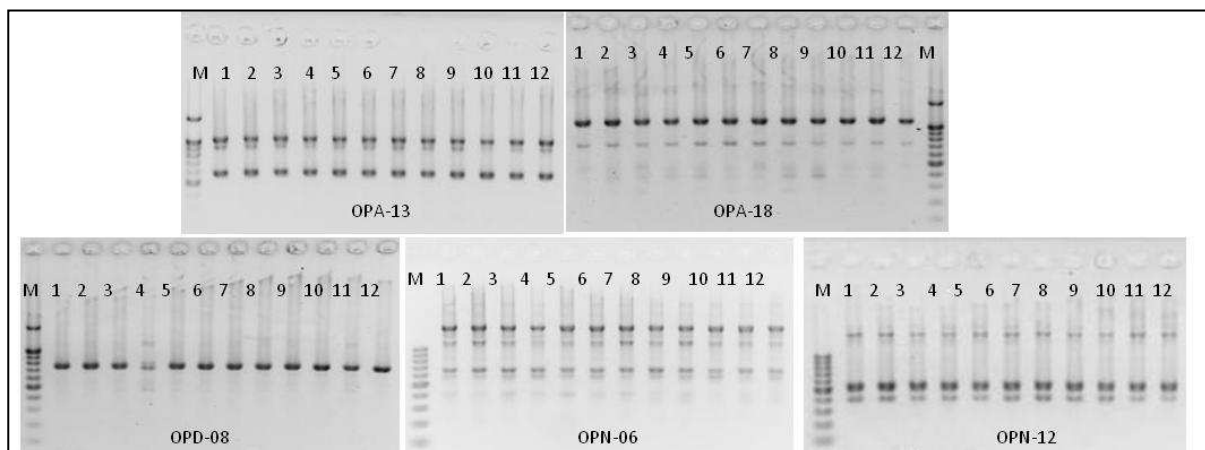
$N_j$  = jumlah pita DNA yang dimiliki genotipe j

#### HASIL

##### Profil DNA tunas pisang kepok 'Unti Sayang' pada tahap subkultur ketiga

Hasil amplifikasi DNA pisang kepok 'Unti Sayang' yang telah disubkultur tiga kali (V1S3) dengan lima primer RAPD menunjukkan pola pita DNA yang jelas dan dapat dibaca untuk setiap primer (Gambar 1).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua sampel yang dianalisis menunjukkan pola pita DNA hasil amplifikasi yang sama pada setiap primer (Gambar 1). Primer OPA-13 menghasilkan tiga pita DNA monomorfik (dimiliki oleh semua sampel) yang berukuran dari 700 bp, 1100 bp dan 1200 bp. Primer OPA-18, OPD-08, OPN-06 dan OPN-12 masing-masing menghasilkan pita DNA monomorfik



**Gambar 1.** Hasil PCR pisang kepok 'Unti Sayang' pada subkultur ketiga dengan lima primer (OPA-13, OPA-18, OPD-08, OPN-06, dan OPN-12). Keterangan: M= DNA marker; 1,2,3 = C-15 (induk/tetua); 4,5,6 = C-15 hasil mikropropagasi V1S3; 7,8,9 = D-15 (induk/tetua); 10,11,12 = D-15 hasil mikropropagasi V1S3

**Tabel 1.** Pola pita DNA tanaman pisang kepok ‘Unti Sayang’ hasil mikropropagasi pada sub-kultur ketiga (V1S3)

Kode Primer	Urutan basa 5’-3’	Jumlah pita	Jumlah pita monomorfik	Similarity index
OPA-13	CAGCACCCAC	3	3 (100%)	1.0
OPA-18	AGGTGACCGT	4	4 (100%)	1.0
OPD-08	GTGTGCCCCA	2	2 (100%)	1.0
OPN -06	GAGACGCACA	6	6 (100%)	1.0
OPN-12	CACAGACACC	4	4 (100%)	1.0

sejumlah 4, 2, 6 dan 4 Tidak ada polimorfisme atau perubahan genetik pada tanaman hasil mikropropagasi, semuanya menunjukkan *similarity index* 1.0 (Tabel 1).

#### **Profil DNA pisang kepok ‘Unti Sayang’ hasil mikropropagasi pada tahap subkultur ke-dua hingga subkultur ke-enam**

Tanaman kontrol dan tanaman pisang kepok ‘Unti Sayang’ hasil mikropropagasi yang menunjukkan variasi dalam bentuk daun keriting, daun tebal, dan ukuran tanaman yang pendek diambil sampel daunnya dan dilakukan analisis DNA. Hasil amplifikasi DNA tanaman yang terpilih dengan tiga primer RAPD dan 2 primer ISSR disajikan pada Gambar 2.

Profil DNA pisang kepok ‘Unti Sayang’ hasil mikropropagasi setelah dua hingga sepuluh subkultur menunjukkan pita-pita DNA yang jelas dan dapat dibaca. Hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer OPA-13 menunjukkan profil pita DNA yang sama pada semua sampel, dengan tiga pita DNA yang berukuran 650 bp, 1100 bp dan 1800 bp, kecuali pada satu sampel No. 18 (B11), yang menunjukkan profil pita DNA yang berbeda dengan 4 pita DNA yang berukuran 500 bp, 600 bp, 700 dan 800 bp (Gambar 2) (Tabel 2).

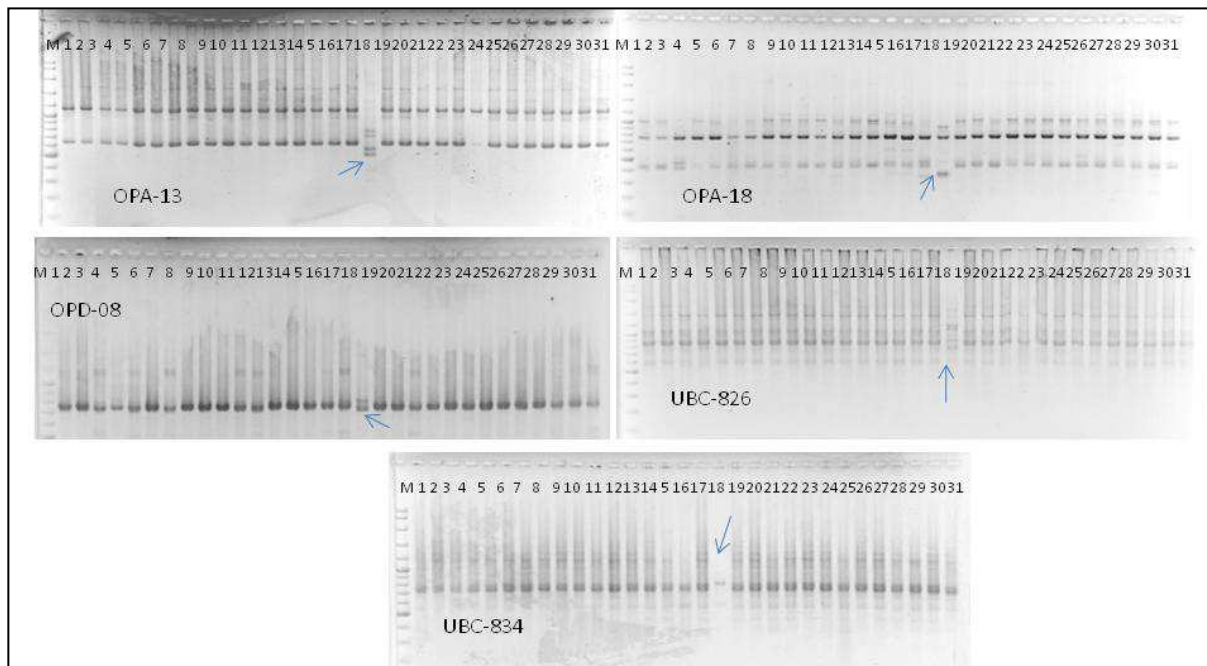
Hasil amplifikasi DNA pisang kepok ‘Unti Sayang’ dengan menggunakan primer OPA-18 menunjukkan profil DNA yang sama pada semua sampel yang diamati, kecuali pada sampel No 18 (C12). Demikian pula hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer OPD-08 menghasilkan profil DNA yang sama pada semua sampel yang diuji, kec-

uali pada sampel No 18 (C12). Sampel pisang kepok B11 adalah salah satu tanaman yang berasal dari hasil mikropropagasi pada subkultur ke empat.

Hasil amplifikasi DNA pisang kepok ‘Unti Sayang’ dengan menggunakan dua marka ISSR juga menghasilkan profil DNA yang sama pada semua sampel yang diamati, kecuali pada sampel No 18. Primer UBC-826 menghasilkan profil DNA yang sama pada semua sampel (dengan empat pita DNA yang berukuran 600 bp, 850 bp, 1100 bp dan 1500 bp), kecuali pada sampel No 18 (C12). C12 (pada subkultur ke empat dengan primer UBC 826) menunjukkan pola pita DNA yang sangat berbeda dengan kontrol, yaitu dengan adanya pita DNA pada ukuran pita 1600, 1200, 1150, dan 800 bp (Gambar 2).

#### **Profil DNA pisang kepok ‘Unti Sayang’ hasil mikropropagasi pada tahap subkultur ke-tujuh hingga subkultur ke-sepuluh**

Hasil amplifikasi DNA pisang kepok hasil mikropropagasi pada tahap subkultur ke-7 hingga ke-10 menghasilkan pola pita DNA yang berbeda pada setiap primer. Dari 22 sampel pisang yang diamati dengan menggunakan tiga primer RAPD (OPA-13, OPA-18 dan OPD-08) dan dua primer ISSR (UBC826 dan UBC 834), tiga sampel pisang memiliki profil DNA yang berbeda (Gambar 3), satu sampel dari subkultur ke-delapan dan dua sampel dari sub-kultur ke sepuluh. Sekuens dari empat primer ini dan jumlah pita DNA yang dihasilkan tertera pada Tabel 3. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa diperoleh 25 fragmen DNA yang berukuran



**Gambar 2.** Pita DNA pisang kepok 'Amorang' dengan lima primer pada subkultur 1-6.

Keterangan: M = DNA marker (Fermentas 100 bp plus)

1-2 = Kontrol,

3-7 = Subkultur 2 (A5, A6, A8, A9, A10),

8-11 = Subkultur 3 (B3, B4, B9, B11),

12-18 = Subkultur 4 (C3, C4, C5, C6, C7, C10, C12)

19-27 = Subkultur 5 (D3, D4, D5, D6, D7, D9, D10, D11, D12)

28-31 = Subkultur 6 (E4, E5, E7, E11)

↗ = pola pita DNA berbeda pada sample no 18 (C12, subkultur 4)

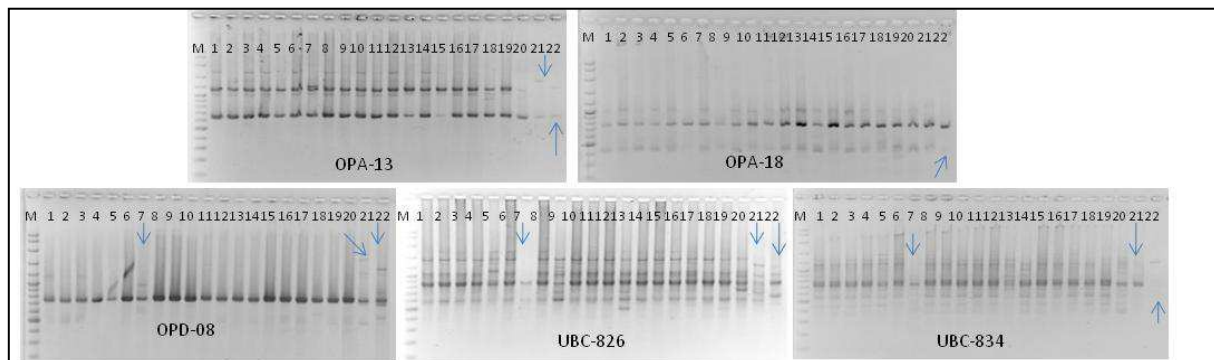
**Tabel 2.** Pola pita DNA tanaman pisang kepok 'Unti Sayang' hasil mikropropagasi ada subkultur ke-2 hingga ke-6 dengan berbagai primer

Kode Primer	Urutan basa (5' - 3')	Jumlah pita	Ukuran pita (bp)
OPA-13	CAGCACCCAC	7	600-1800
OPA-18	AGGTGACCGT	5	450-1000
OPD-08	GTGTGCCCCA	3	750-1200
UBC-826	(AC) <sub>8</sub> C	7	500-1800
UBC-834	(AG) <sub>8</sub> YT	7	350-1300
Jumlah		27	

dari 500bp hingga 2.0 kb, dengan 86.21% merupakan pita polimorfik dan hanya 4% fragmen DNA (13.79%) yang monomorfik. Dari 4 primer yang digunakan, semuanya menunjukkan polimorfisme (Tabel 3).

Dari 22 sampel yang diuji, tiga individu (G7

pada subkultur ke-8, I10, I12 pada subkultur ke-10) menunjukkan pola pita DNA yang berbeda dengan kontrolnya pada 4 primer yang diuji (Gambar 3). Pada individu G7 (subkultur ke-8 dengan primer UBC 826) terjadi hilangnya pita DNA pada ukuran 1700, 1500, dan 1100 bp dan dengan primer UBC-



**Gambar 3.** Pola pita DNA D-15 dengan lima primer pada berbagai subkultur (7-10)

- M = DNA marker (Fermentas 100 bp plus)
  - 1 = Subkultur 6 (E12)
  - 2-3 = Subkultur 7 (2 = F9, 3 = F10),
  - 4-11 = Subkultur 8 (4=G3, 5=G4, 6 = G6, 7 = G7, 8 = G8, 9 = G9, 10 = G10, 11 = G12),
  - 12-18 = Subkultur 9 (12=H3, 13= H7, 14 = H8, 15 = H9, 16 = H10, 17 = H11, 18 = H12)
  - 19-22 = Subkultur 10 (19 = I5, 20 = I6, 21 = I10, 22 = I12)
- ↙ = pola pita DNA yang berbeda

**Tabel 3.** Pola pita DNA tanaman pisang kepok ‘Unti Sayang’ hasil mikropropagasi pada subkultur ke-7 hingga ke-10 dengan berbagai primer

Kode Primer	Urutan basa (5' - 3')	Jumlah pita	Ukuran pita (bp)
OPA-13	CAGCACCCAC	3	600-1800
OPA-18	AGGTGACCGT	3	450-1000
OPD-08	GTGTGCCCCA	4	750-1500
UBC-826	(AC) <sub>8</sub> C	7	500-1800
UBC-834	(AG) <sub>8</sub> YT	7	350-1300
	Jumlah	27	

834 pada ukuran 350 bp, 450 bp, 550 bp dan 650 bp (Gambar 3). Hilangnya pita DNA terjadi juga pada sampel 21 dan 22 (I10 dan I12) dengan menggunakan primer OPA-13 dan OPB-18. Sedangkan dengan menggunakan primer OPD-08, terjadi penambahan pita DNA pada ukuran 1300 bp dan 1500 bp pada sampel no 21 dan 22 (I10 dan I12).

**PEMBAHASAN**

Masalah utama yang dihadapi kultur *in vitro* yaitu adanya variasi somaklonal diantara sub-klon dari satu galur induk, yang muncul sebagai akibat langsung dari kultur sel, jaringan atau organ tanaman *in vitro* (Lakshmanan *et al.*, 2007; Ramage *et al.*,

2004). Untuk mengetahui sampai sejauh mana variasi somaklonal berdampak terhadap perbanyakan massal tanaman, uji stabilitas genetik hasil mikropropagasi perlu dilakukan. Modgil *et al* (2005) menyarankan untuk menguji stabilitas genetik tanaman hasil mikropropagasi, sebaiknya dilakukan dengan menggunakan kombinasi dua macam marker yang mengamplifikasi region yang berbeda dari genom. Pada penelitian ini dua teknik PCR digunakan yaitu RAPD dan ISSR untuk menguji *clonal fidelity* karena kedua teknik ini sangat sederhana dan *cost effective* serta hanya membutuhkan sedikit sample DNA dan tidak memerlukan informasi sekuens sebelumnya dan

relatif cepat (Lakshmanan *et al.*, 2007). Selain itu, penggunaan dua marker, yang mengamplifikasi region yang berbeda, memberikan kemungkinan yang lebih baik untuk mengidentifikasi variasi genetik dalam satu klon (Martin *et al.*, 2006).

Protokol perbanyak tanaman secara *in-vitro* idealnya dapat menyediakan sejumlah tanaman yang seragam dalam waktu yang relatif singkat dengan persentase variasi simaklonal yang minimal. Semakin banyak tahap sub-kultur, jumlah tanaman akan semakin banyak, namun peluang untuk terjadinya variasi somaklonal akan semakin besar. Olehkarenanya, pengujian kestabilan genetik dilakukan hingga sub-kultur ke-10. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya kesamaan genetik antara tanaman kontrol dengan tanaman hasil mikropropagasi hingga sub-kultur ke-3, subkultur ke5 hingga ke-7, serta subkultur ke-9 dengan menggunakan marka RAPD dan ISSR. Pada subkultur ke-4, ke-8 dan ke-10, empat tanaman hasil mikropropagasi menunjukkan perubahan profil DNA yang berupa hilangnya fragmen DNA maupun adanya penambahan fragmen DNA. Penyebab pasti variasi somaklonal pada kultur *in vitro* masih belum diketahui, walaupun dipercaya bahwa perubahan dalam konsentrasi auxin-cytokinin dalam kultur *in vitro* dan rasionya, lamanya kultur *in vitro*, cekaman *in vitro* karena kondisi tidak alami, perubahan ritme diurnal dan kondisi nutrisi secara bersama atau independen bertanggung jawab terhadap variasi somaklonal (Modgil *et al.*, 2005).

Lebih lanjut lagi, Oh *et al.* (2007) mengungkapkan bahwa mekanisme yang terjadi pada beberapa variasi somaklonal dapat diimplikasikan dengan terjadinya berbagai tipe mutasi dalam variasi somaklonal, termasuk *point mutations*, duplikasi gen, perubahan susunan kromosom, dan perubahan jumlah kromosom (Kaeppeler *et al.*, 2000; Peschke dan Phillips, 1992; Phillips *et al.*, 1994), serta pergerakan *transposable element* dan perubahan dalam metilasi DNA (Koukalova *et al.*, 2005; Kubis *et al.*, 2003; Smulders *et al.*, 1995). Locus spesifik seperti ini sangat penting dalam identifikasi genetik dari satu genotipe atau somaklon dengan yang lainnya. Karena perubahan satu basa saja pada situs

penempelan primer dimanifestasikan sebagai ada/tidaknya pita RAPD, maka dapat disimpulkan bahwa kondisi kultur jaringan telah menginduksi berbagai perubahan genetik pada tanaman *regenerant*. Demikian juga, adanya pita DNA spesifik pada tanaman *regenerant* dari berbagai sub-kultur menunjukkan bahwa penggunaan teknik kultur jaringan pada tahapan tertentu menimbulkan variasi pada pisang (Sheidai *et al.*, 2008).

## KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan kesamaan profil DNA RAPD dan ISSR antara tanaman kontrol dan tanaman hasil mikropropagasi hingga sub-kultur ke-3, sub-kultur ke-5 hingga ke-7 dan pada sub-kultur ke-9. Perubahan profil RAPD dan ISSR terdapat pada satu sampel tanaman pisang hasil mikropropagasi pada tahapan sub kultur ke-4, satu tanaman pada sub-kultur ke-8 dan dua tanaman pada sub-kultur ke-10. Perubahan profil DNA yang diamati berupa hilangnya fragmen DNA dan penambahan fragmen DNA pada ukuran tertentu. Walaupun beberapa perubahan morfologi tanaman dan perubahan profil DNA ditemukan selama tahapan multiplikasi yang lebih lanjut (sub-kultur ke-8 dan ke-10), protokol kultur jaringan yang dikembangkan ini menghasilkan tanaman klonal yang relatif stabil pada awal tahap sub-kultur (hingga tahap sub-kultur ke-3). Dari hasil penelitian ini juga dapat dikonfirmasi bahwa penggunaan dua marka RAPD dan ISSR dapat digunakan untuk menguji kestabilan genetik tanaman pisang kepok 'Unti Sayang' hasil mikropropagasi.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terselenggara atas bantuan dana dari Program Kompetitif LIPI: Perbanyak Pisang Kepok Unti Sayang Tahan Penyakit Darah Melalui Proliferasi Tunas *In Vitro* Tahun 2008 - 2010.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bhagyalakshmi N and NS Singh. 1995. Role of liquid versus agar-gelled media in mass propagation and *ex vitro* survival in bananas. *Plant Cell Reports* 41(1), 71-73.
- Delaporta SL, J Wood and JB Hicks. 1983. A plant DNA

- minipreparation. Version II. *Plant Molecular Biology Reports* **4**, 19–21.
- Escalant JV, C Tession and F Cote. 1994.** Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.) *In vitro Cell Dev. Biol.* **30**, 181-186.
- El-Doug Doug KA, HMS El-Harti, HM Korkar, and RM Taha. 2007.** Detection of somaclonal variation in banana tissue culture using isozyme and DNA fingerprint analysis. *Journal of Applied Science Research* **3**(7), 622-627.
- Imelda M. 2010.** *Perbanyak pisang kepok amorang tahan penyakit darah melalui proliferasi tunas in vitro* (Belum dipublikasi).
- Israeli Y, E Lahav and O Reuveni. 1995.** *In vitro* culture of bananas. *Fruits* **43**, 219-223.
- Harirah AA and N Khalid. 2006.** Direct regeneration and RAPD assessment of male inflorescence derived plants of *Musa acuminata* cv. Berangan. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **14**(1), 11-17.
- Kaeppler SM, HF Kaeppler and S Rhee. 2000.** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* **43**, 179–188
- Koukalova B, M Fojtova, YK Lim, J Fulnecek, AR Leitch and A Kovarik. 2005.** Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. *Plant Physiology* **139**, 275–286.
- Kubis SE, AMMF Castilho, AV Vershinin and JS Heslop-Harrison. 2003.** Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Mol Biol* **52**, 69–79.
- Krikorian AD, H Irizarry, SS Cronauermitra and E Rivera. 1993.** Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa AAB*) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Annals of Botany* **71**(6), 519-535.
- Lakshmanan V, SR Venkataramareddy, and B Neelwarne. 2007.** Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* **10**(1) Issue of January 15, 2007
- Leroy XJ, K Leon, JM Hily, P Chaumeil P and M Branchard. 2001.** Detection of *in vitro* cultured-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **102**(6-7), 885-891.
- Martin KP, SK Pachathundikandi, C-L Zhang, A Slater, and J Madassery. 2006.** RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant* **42**(2), 188-192.
- Modgil M, K Mahajan, SK Chakrabarti, DR Sharma and RC Sobti. 2005.** Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock. *Scientia Horticulturae* **104**(2), 151-160.
- Nei M and Li WH. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**, 5269-5273.
- Novak FJ, R Afza, M Va Duren, M Preadallos, BV Conger and T Xiaolang. 1989.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio-Technology* **7**(2), 154-159.
- Oh TJ, MA Cullis MA, K Kunert, I Engelborgh, A Swennen and CA Cullis. 2007.** Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). Available on line at: [https://www.up.ac.za/dspace/bitstream/2263/2703/.../Oh\\_Genomic\(2007\).pdf](https://www.up.ac.za/dspace/bitstream/2263/2703/.../Oh_Genomic(2007).pdf).
- Peschke VM and RL Phillips. 1992.** Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Adv Genet* **30**, 41–75.
- Phillips RL, SM Kaepler and P Olhoft. 1994.** Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5222–5226.
- Poerba YS and F Ahmad. 2010.** Genetic variability among 18 cultivars of cooking bananas and plantain by RAPD and ISSR markers. *Biodiversitas* **11**(3), 118-123.
- Ramage CM, AM Borda, SD Hamill and MK Smith. 2004.** A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish banana (*Musa* spp. AAA). *Scientia Horticulturae* **103**(1), 145-151.
- Ray T, I Dutta, P Saha, S Das and SC Roy. 2006.** Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **85**(1), 11-21.
- Sahijram L, JR Soneji, and KT Bollamma. 2003.** Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **39**, 551–556.
- Sheidai M, H Aminpoor H, Z Noormohammadi and F Farahani. 2008.** RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis* **52**(2), 307-311. Available on line at: <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>
- Simmonds NW and K Shepherd. 1955.** The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Linnean Society. Botanical J.* **55**, 302-312.
- Smulders MJM, W Rus-Kortekaas and B Vosman. 1995.** Tissue culture induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theor Appl Genet* **91**, 1257–1264.
- Venkatachalam L, RV Sreedhar, and N Bhagyalakshmi. 2007.** Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. *In Vitro Cell Dev Biol. Plant* **43**, 267-274.
- Widjaya EA dan YS Poerba. 2004.** Pengumpulan data plasma nutfah dan genetika. *Dalam* Rugayah, EA Widjaya dan Praptiwi (Editor). *Pedoman Pengumpulan Data Keanekaragaman Flora*, 113-140. Pusat Penelitian Biologi–LIPI.
- Williams JG, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalsky and SV Tingey. 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* **18**, 6531-6535.