

Persilangan Pisang Liar Diploid *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (RIDL.) Nasution Sebagai Sumber Polen dengan Pisang Madu Tetraploid

Yuyu S. Poerba*, Fajarudin Ahmad* & Witjaksono**

*Pusat Penelitian Biologi – LIPI, **Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI

Cibinong Science Center. Jalan Raya Jakarta- Bogor Km 46, Cibinong, Bogor 16911

ABSTRACT

Hybridization of wild diploid *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (Ridl.) Nasution as pollen source with tetraploid Pisang Madu. Indonesia and South East Asia is the center of origin and genetic variability of bananas, specifically species *Musa acuminata* Colla. At least 15 varieties of wild *Musa acuminata* are found in Indonesia. Some of them have resistances for several diseases of bananas. One approach in banana breeding program is hybridizing between tetraploid parent and diploid parent of banana. This research was aimed to produce new triploid banana hybrid by crosses between tetraploid female parent 'Pisang Madu' and wild diploid male parent *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (Ridl.) Nasution. From 302 crosses, 53.9% of crosses produced seeds. However, only 48.46% of seeds contained embryos, and only 1.27% of embryos grew and developed. Bunch weight and leaf length of hybrid plants were not significantly different with female parent, tetraploid Pisang Madu. Plant height of the hybrids was not significantly different with male parent, wild diploid *Musa acuminata* var *malaccensis*. Pseudostem diameter and leaf width of the hybrid plants were between female tetraploid parent and male wild diploid parent. RAPD profiles (DNA bands) of the hybrids were originated from the female parent, male parent and both parents were 38.46, 34.6, and 26.92%, respectively. The hybrids were confirmed to be triploids ($3x=33$).

Keywords: banana, breeding, hybrids, tetraploid, wild diploid, Pisang Madu, *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (Ridl.) Nasution

PENDAHULUAN

Indonesia dan Asia Tenggara merupakan pusat keragaman pisang (*Musaceae*) yang tersebar hampir di seluruh Indonesia (Nasution 1991). Lebih dari dua ratus varietas ditanam oleh petani yang seluruhnya adalah varietas alami yang belum mengalami perbaikan/pemuliaan. Selain itu, terdapat paling sedikit 15 varietas liar berbiji *Musa acuminata* Colla (Nasution 1991) sangat bervariasi dari karakter ukuran buah hingga morfologi biji. Keanekar-

agaman plasma nutfah pisang ini dapat digunakan sebagai sumber daya genetik untuk pemuliaan pisang. Indonesia juga merupakan sumber keragaman genetik patogen pisang yang meliputi penyakit Panama atau layu *Fusarium* (patogen: *Fusarium oxysporum* var. *cubense*), Sigatoka (patogen: *Mycosphaerella musicola*), *Pseudomonas* sp., nematoda, dan virus (Banana Bunchy Top Virus/BBTV, Banana Streak Virus/BSV, Cucumber Mosaic Virus/BMV dan Banana Bract Mosaic Virus/BBrMV).

Varietas pisang yang dibudidayakan masyarakat telah banyak mengalami tekanan lingkungan terutama penyakit layu *Fusarium*. Usaha penanaman pisang varietas Cavendish atau varietas lain seperti Raja (AAB), Ambon Lumut (AAA), Barangan (AAA) dalam sistem monokultur pada areal yang agak luas seringkali menemui kehancuran akibat penyakit layu *Fusarium*, walaupun varietas-varietas ini bertahan hidup dalam rumpun-rumpun yang terpisah. Pengendalian penyakit ini secara kimia tidak efektif karena sifat patogen yang tular tanah.

Salah satu cara untuk pengendalian penyakit ini adalah dengan menggunakan varietas pisang tahan penyakit layu *Fusarium*. Hibrid triploid tahan penyakit menjadi target pemuliaan pisang karena triploid mempunyai vigor dan produktifitas paling baik. Hibrid triploid tahan *Fusarium* dapat diperoleh dengan persilangan antara tetua betina tetraploid dan jantan diploid (Stover & Buddenhagen 1986), dengan sifat ketahanan penyakit dimasukkan dari tetua jantan diploid sebagai sumber polen kedalam hibrid triploid baru (Stover & Simmonds 1987). Pendekatan tersebut telah dilakukan dengan menggunakan tetua betina tetraploid dengan tetua jantan diploid pisang liar dan budidaya hibrid telah diperoleh dengan frekuensi yang bervariasi dari 30-88% (Ortiz *et al.* 1998a) dan 3.8%-94.1% (Osebele *et al.* 2006a), tergantung tetua yang digunakan (Ortiz *et al.* 1998a; Osebele *et al.* 2006a, Ortiz 1997, Ortiz & Vuylsteke 1995).

Pemilihan tetua jantan sangat kritis dan sangat menentukan dalam strategi

untuk menghasilkan hibrid triploid (Osebele *et al.* 2006). Selain harus memiliki fertilitas polen yang tinggi, tetua jantan biasanya digunakan sebagai sumber ketahanan hama/penyakit (Ortiz *et al.* 1998b). Pisang liar memiliki fertilitas polen dan viabilitas polen yang lebih tinggi dibandingkan dengan pisang domestikasi/budidaya (Dumple & Ortiz, 1996; Ortiz *et al.* 1998b), dan biasanya memiliki sumber ketahanan terhadap penyakit sangat menguntungkan digunakan sebagai tetua jantan (Ortiz *et al.* 1998b). Penelitiannya Ortiz *et al.* (1998b) 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').

Oleh karena itu, pada penelitian ini, pemanfaatan tetua jantan liar *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (Ridl.) Nasution sebagai sumber polen yang mempunyai sifat ketahanan terhadap *Fusarium*, digunakan dalam pemuliaan pisang triploid tahan *Fusarium*. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan hibrid pisang triploid baru melalui persilangan tetua betina pisang madu tetraploid hasil induksi dengan tetua diploid pisang liar *Musa acuminata* var *malaccensis*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pisang Madu tetraploid (AAAA) hasil induksi poliploid digunakan sebagai tetua betina untuk diserbuki dengan

serbuk sari dari tetua jantan diploid, pisang liar *Musa acuminata* var *malaccensis* (AA wild). Pisang madu tetraploid memiliki keunggulan sebagai berikut: diameter buah yang lebih besar dibandingkan dengan diploidnya, rasa buah manis, tangkai buah tidak mudah rontok, kulit buah tidak menempel pada daging buah. Sedangkan tetua jantan, *Musa acuminata* var *malaccensis* diploid (AA wild) merupakan pisang liar berbiji, tahan terhadap penyakit penyakit layu Fusarium.

Sejumlah 302 persilangan dilakukan dengan mengambil serbuk sari dari pisang liar *M. acuminata* var *malaccensis* dan menyerbukkannya pada bunga betina Pisang Madu tetraploid. Penyerbukan dilakukan pada pagi hari antara jam 8-10, 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.

Sejumlah 163 biji 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 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⁻¹ gula, 100 mg l⁻¹ myo inositol, 4 mg l⁻¹ thiamine HCl dengan tambahan 2 mg/l BA.

Biak tunas yang telah berhasil diiniasi dipelihara dan diperbanyak dengan subkultur 1-3 bulan pada medium garam formulasi MS (Murashige dan Skoog, 1962), 30 g l⁻¹ gula, 100 mg l⁻¹ myo inositol, 4 mg l⁻¹ thiamine HCl dan 2 mg l⁻¹ 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 perkembangannya. Data-data pertumbuhan dan reproduksi, data morfologi dilakukan sesuai dengan Descriptors for Banana (*Musa* spp.) (IPGRI-INIBAP/CIRAD 1996).

Untuk membandingkan penampilan tanaman hibrid dengan tetuanya, beberapa karakter agronomis seperti

bobot tandan, tinggi tanaman, diameter batang, panjang dan lebar daun, serta panjang tandan diamati. Analisis statistik dilakukan dengan Uji-T (Steel & Torrie, 1980).

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. Analisis RAPD dilakukan dengan metoda Williams *et al* (1990). Amplifikasi DNA dilakukan dengan Thermal Cycler (Takara) dengan kondisi amplifikasi sebagai berikut: Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode Williams *et al.* (1990) dengan menggunakan lima primer RAPD terpilih, yaitu OPA-18, OPA-13, OPD-08 OPN-06 dan OPN-12 (Operon Technology Ltd). Reaksi PCR dilakukan pada volume total 15 μ l yang berisi 0.2 nM dNTPs; 1X bufer reaksi; 2mM $MgCl_2$; 25 ng DNA sample; 1 pmole primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) dengan menggunakan Thermocycler (Takara) selama 45 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 94°C selama 2 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 5 menit proses ekstensi fragmen DNA pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 25°C. Hasil amplifikasi PCR divisualisasi pada gel agarosa 2.0% dalam bufer TAE (Tris-EDTA) secara elektroforesis dengan menggunakan Mupid Mini Cell selama 50 menit pada

50 Volt. Kemudian direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi akhir 1 μ l/100 ml selama 10 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA dideteksi dengan menggunakan UV transluminator, kemudian difoto dengan menggunakan geldoc (Takara). Sebagai standar ukuran DNA digunakan 100 bp plus DNA ladder (Fermentas) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

Analisa ploidi 13 sampel hibrid, tiga sampel tetua betina, dan tiga sampel tetua jantan menggunakan larutan Cystain UV-ploidy (Partec, Germany) yang berisi *buffer* dan pewarna DNA. Potongan daun berukuran sekitar 100 cm² diambil dari tanaman di kebun, diberi label dan disimpan di wadah plastik. Di antara daun diselipkan kertas *tissue* yang dibasahi dengan aquades. Potongan daun berukuran 0,5 cm² diletakkan di *petridish* dan ditetesi 1,5 ml *buffer cystain UV-Ploidy* (Partec, Germany) dan dicacah dengan silet. Cacahan daun disaring dengan saringan 30 μ m dan filtrat dimasukkan 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* 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 Madu tetraploid dengan *Musa acuminata* var *malaccensis* diploid

Dari 302 persilangan yang dilakukan dihasilkan 163 biji (53.97%) (Tabel 1). Namun demikian, dari 163 biji hibrid pisang hanya 79 (48.46%) saja yang mengandung embrio. Dengan teknik kultur embrio, ke-79 embrio ini kemudian diselamatkan. Walaupun demikian, tidak semua embrio dapat hidup dan bertumbuh, dan hanya satu embrio (1.27%) saja yang hidup dan bertunas.

Dari satu genotip embrio hibrid pisang yang bertunas, kemudian diperbanyak secara *in vitro*, kemudian diaklimatisasi dan ditanam di lapang.

Penampilan morfologi tanaman pisang hibrid

Dari pengamatan penampilan (habitus tanaman), hibrid pisang mempunyai habitus merunduk (Gambar 1b) yang menunjukkan morfologi pisang poliploid, yang dicirikan dengan menjuntainya pelepah daun. Penampilan tanaman (habitus tanaman) yang merunduk ini lebih menyerupai tetua betina Pisang Madu tetraploid (Gambar 1a), dibandingkan dengan tetua jantan diploid *Musa acuminata* var *malaccensis* yang memiliki habitus tegak (Gambar 1c).

Tabel 1. Persilangan Pisang Madu tetraploid dengan pisang liar diploid *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (Ridl.) Nasution.

Nomor Persilangan	Jumlah Persilangan	Jumlah biji	Jumlah embrio	Σ embrio yang bertunas
I 8A#4(2) x II 17B#3	22	16	10	0
I 8A#4(3) x II 17B#3	21	9	5	0
I 8A#4(4) x II 17B#3	21	52	22	0
I 8A#4(5) x II 17B#2	21	40	19	0
I 8A#4(6) x I 20B#3	21	21	12	1
I 8A#4(7) x I 20B#3	21	25	11	0
I 8A#4(8) x I 17B#3	18	0	0	0
I 8A#2(1) x II 17B#4	27	0	0	0
I 8A#2(2) x II 17B#4	29	0	0	0
I 8A#5(1) x I 20B#4	22	0	0	0
I 8A#5(2) x I 20B#5	21	0	0	0
I 8A#5(3) x I 20B#6	17	0	0	0
I 8A#5(4) x I 20B#4	17	0	0	0
I 8A#5(5) x I 20B#4	17	0	0	0
I 8A#5(6) x I 20B#4	7	0	0	0
Jumlah	302	163	79	1

Pseudostem (batang semu) berbentuk silinder dengan tinggi mencapai 2,40 m, berwarna hijau kekuningan. Warna yang dominan pada bagian bawah *pseudostem* adalah hijau kekuningan dengan warna pigmentasi merah muda (Gambar 2B1). Getah *pseudostem* keruh seperti susu, lebih menyerupai tetua betinanya dibandingkan dengan tetua jantan yang memiliki getah jernih seperti air (Gambar 2C2). Lapisan lilin pada lembaran daun sangat sedikit seperti kedua tetuanya (Gambar 2A3,2C3).

Permukaan daun bagian atas berwarna hijau lebih terang dibandingkan dengan tetua betina yang berwarna hijau gelap, dan lebih terang dibandingkan dengan tetua betina yang hijau agak suram, sedangkan bagian bawahnya berwarna hijau muda (Gambar 2A3, 2B3, 2C3). Bagian kiri dan kanan pangkal daun berukuran tidak sama (asimetris) dengan bentuk yang membulat lebih menyerupai tetua jantannya (Gambar 2A3, 2B3, 2C3).

Bagian pangkal dari tangkai daun mempunyai ornamen bercak berwarna cokelat seperti kedua tetuanya (Gambar 2A4,2B4,2C4). Tipe lekuk tangkai daun (*petiole canal*) pada daun ketiga tanaman hibrid terbuka dengan tepi berombak, yang lebih menyerupai tetua betinanya, dibandingkan dengan tetua jantan yang memiliki tipe lebar dengan tepi tegak (Gambar 2A5, 2B5,2C5). Bentuk *male bud* (jantung) hibrid intermediate dari kedua tetua(ovoid-tetua betina, seperti gasing-tetua jantan). Braktea akan menggulung sebelum jatuh,

seperti kedua tetuanya (Gambar 2A6, 2B6, 2C6).

Tandan buah dengan total panjang (*peduncle*) 43-46 cm. Posisi *bunch* (tandan buah) miring merupakan bentuk intermediate dari kedua tetuanya. Susunan buah *biseriate* (buah tersusun dalam dua baris) seperti kedua tetuanya (Gambar 3), ukuran buah lebih panjang dan diameter buah lebih kecil dibandingkan kedua tetuanya (Gambar 3). Penampilan tanaman dan morfologi tanaman pisang hibrid dan kedua tetuanya disarikan pada Tabel 2.

Karakter Agronomis Hibrid

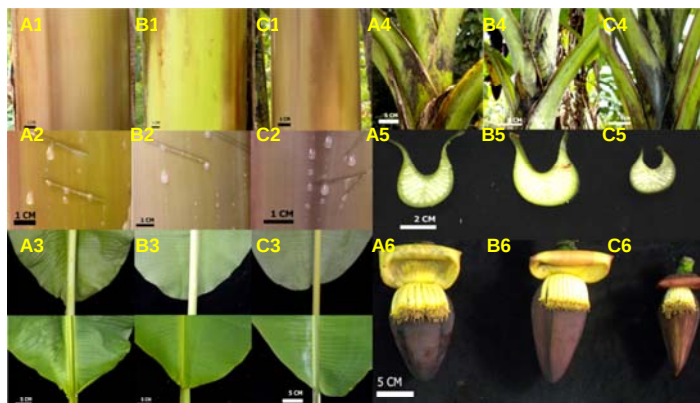
Hasil uji T lima karakter agronomis tetua persilangan dan hibridnya tertera pada Tabel 3. Bobot tandan dan panjang daun hibrid tidak berbeda nyata dengan tetua betina, Pisang Madu tetraploid, tetapi sangat berbeda nyata dengan tetua jantannya, *Musa acuminata* var *malaccensis*. Tinggi tanaman pisang hibrid berbeda nyata dengan tetua betina, tetapi tidak berbeda nyata dengan tetua jantannya. Sedangkan pada karakter diameter batang dan lebar daun tanaman hibrid sangat berbeda nyata dengan kedua tetuanya.

Analisis hibrid pisang dengan marka RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*)

Identifikasi molekuler hibrid dilakukan dengan menggunakan empat primer RAPD, yaitu OPA-07, OPA-13, OPB -07, dan OPB-18. Untuk setiap primer dan hibrid, analisis RAPD dilakukan untuk mengkarakterisasi pola pita DNA (Chundet *et al.*, 2007). Pola



Gambar 1. Penampilan tanaman pisang madu tetraploid (a), hibrid (b) dan *Musa acuminata* Colla var *malaccensis* (Ridl.) Nasution (c)



Gambar 2. Penampilan morfologi Pisang Madu Tetraploid (A), hibrid (B) dan *Musa acuminata* var *malaccensis* (C). Ket: 1. Batang bagian dalam, 2. Getah, 3. Pangkal lamina, 4. Bercak, 5. Petiol canal, 6. Jantung



Gambar 3. Penampilan tandan dan buah pisang hibrid (B) dibandingkan dengan kedua tetuanya: Pisang Madu Tetraploid (A) dan *Musa acuminata* var *malaccensis* (C)

Tabel 2. Perbandingan karakter morfologi pisang hibrid dengan kedua tetuanya

Sub no.	Karakter	Pisang Madu 4x (Tetua ?)	<i>M.acuminata</i> var <i>malaccensis</i> (Tetua ?)	Pisang Madu x <i>M.a. malaccensis</i> (hibrid)
Penampilan Tanaman secara umum				
1.1	Habitus daun	Merunduk	Tegak	Merunduk
Batang semu				
2.1	Tinggi batang semu (cm):	237-285	180-230	220-240
2.2	Diameter batang semu (cm)	19.4-25.5	7.6-8.5	14-17.5
2.3	Penampilan batang semu :	Kekar	Ramping	Sedang
2.4	Warna batang semu	Hijau muda	Hijau bercak coklat	Hijau muda
2.5	Pigmentasi pada batang semu bagian dalam	Merah muda-ungu	Hijau muda	Merah muda-ungu
2.6	Jumlah anakan	7±1	8±1	8±1
Daun (daun III)				
3.1	Panjang helaian daun (cm)	225±34	200	209±8
3.2	Lebar helaian daun	71±4	60	72±6
3.3	Rasio daun	3±0.3	3.3	2.9±0.2
3.4	Panjang tangkai daun (cm)	41±8	73	45±6
3.5	Warna permukaan atas daun	Hijau muda (lebih tua dp diploidnya)	Hijau	Hijau muda
3.6	Warna permukaan bawah daun	Hijau muda (lebih tua dp diploidnya)	Hijau muda	Hijau muda
Perbungaan				
4.1	Panjang Ibu tangkai bunga (cm)	-		
4.2	Diameter ibu tangkai bunga (cm)	5±0.5	4	5±0.5
4.3	Panjang tandan (cm)	38±1	25	44±2
4.4	Posisi tandan	Tergantung vertikal	Horizontal	Tergantung miring
Buah				
5.1	Posisi buah	Paralel terhadap ibu tangkai	Paralel terhadap ibu tangkai	Paralel terhadap ibu tangkai
5.2	Jumlah buah	>17	>14	>17
5.3	Panjang buah (cm)	10±0.9	8.5±1.5	11±1.6
5.4	Lebar buah (cm)	2.6±0.2	1.9±0.2	2.8±0.8
5.5	Ujung buah	Tumpul	Tumpul	Tumpul
5.6	Sisa kepala putik	Terdapat pangkal sisa putik	Terdapat pangkal sisa putik	Terdapat pangkal sisa putik
5.7	panjang tangkai buah (mm)	<10 mm	<10 mm	<10 mm
5.8	Lebar tangkai buah (mm_)	5 to 10 mm	5 to 10 mm	5 to 10 mm
5.9	Rasa buah	Manis gula (seperti pisang mas)	Agak manis	Agak manis
5.10	Berat tandan (kg)	8±2	2±0.5	8±2
5.11	Jumlah sisir	9±1	8±2	9±1
5.12	Jumlah buah persisir (6 sisir pertama)	22±3	15±2	21±3

Tabel 3. Hasil Uji T lima karakter agronomis pisang hibrid dan kedua tetuanya.

Tanaman	Bobot tandan (kg)	Tinggi batang (cm)	Diameter batang (cm)	Panjang daun (cm)	Lebar daun (cm)
Pisang Madu (4x)	7.13 ± 0.81	272.2 ± 21.36	72.4 ± 2.23	243.2 ± 36.68	70.8 ± 10.45
Hibrid	6.57 ± 0.57	226 ± 8.22	48.0 ± 2.03	254.2 ± 20.07	74.6 ± 7.02
<i>Musa acuminata</i> var <i>malaccensis</i>	1.23 ± 0.25	212.4 ± 21.42	24.3 ± 0.85	220.2 ± 18.67	49.2 ± 5.12
Uji T untuk					
Madu (4x) vs Hibrid	NS	**	**	NS	**
Diploid vs Hibrid	***	NS	***	**	**

Keterangan: NS= tidak berbeda nyata, **, ***) berbeda nyata pada taraf uji 0.05 dan 0.01

pita (profil) DNA hasil amplifikasi dengan empat primer profil DNA yang jelas, dapat dibaca dan diskor (Gambar 5). Untuk menentukan laju transmisi marker, pita DNA untuk setiap tetua dan hibrid diberi skor dan jumlah pita yang diturunkan kepada setiap hibrid dicatat sebagai persentase laju transmisi, seperti yang tertera pada Tabel 4 (kolom 6).

Dengan menggunakan primer OPA-07, pisang Madu memiliki 4 pita DNA berukuran dari 500 hingga 3000 bp, hibrid pisang memiliki 6 pita DNA yang berukuran 250 hingga 3000 bp, sedang *Musa acuminata* var *malaccensis* memiliki 7 pita DNA. Seperti yang terlihat pada Tabel 2, pada tanaman pisang hibrid terdapat 10 pita DNA spesifik dari pisang Madu tetraploid yang tidak terdapat pada *Musa acuminata* var *malaccensis*, 13 pita DNA spesifik dari *Musa acuminata* var *malaccensis*, dan 7 pita DNA yang berasal dari (dimiliki bersama) kedua tetuanya.

Identifikasi tingkat ploidi hibrid dengan Flowcytometer

Sejumlah 13 tanaman hibrid yang diamati memiliki tingkat ploidi triploid (3x)

yang dikonfirmasi dengan Flowcytometer (Tabel 5, Gambar 4).

PEMBAHASAN

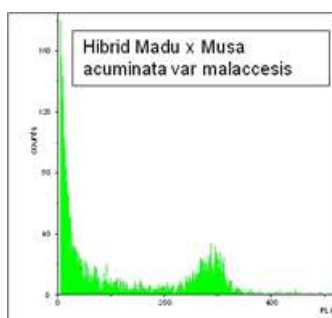
Persilangan pisang Madu tetraploid dengan *Musa acuminata* var *malaccensis* diploid

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.

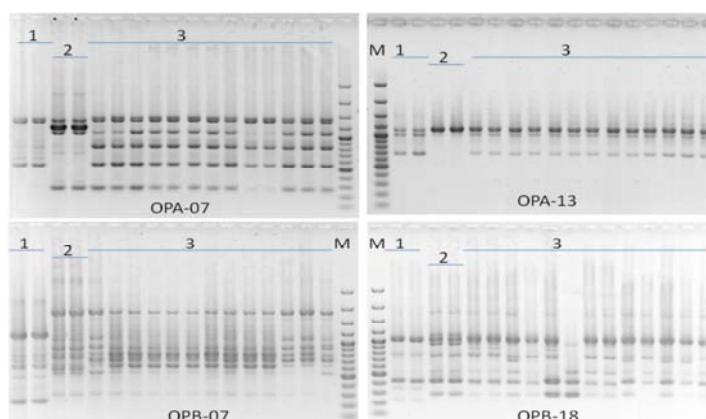
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 53.97% penyerbukan menghasilkan biji. Hal ini menunjukkan bahwa frekuensi pembentukan biji hibrid cukup tinggi, seperti halnya penelitian Ortiz&

Tabel 4. Jumlah dan ukuran pita DNA yang diturunkan tetua betina Pisang Madu (4x, AAAA), tetua jantan *Musa acuminata* var *malaccensis* (2x, AA wild) kepada hibrid dengan primer OPA-07, OPA-13, OPB-7 dan OPB-18.

No	Primer, sekuen (5'-3')	Pisang Madu (4x, AAAA, ♀)	<i>Musa acuminata</i> var <i>malaccensis</i> (2x, AA wild, ♂)	Hibrid (♀x♂)	Persentase pita RAPD yang diturunkan ke hibrid dari tetua			Tdk kedua nya
1	OPA-07, GAAACGGGTG				♀	♂	♀+♂	
	Ukuran pita (bp)							
	3000	+	-	+	+	-	-	-
	2500	-	+	-	-	-	-	-
	1300	+	-	+	+	-	-	-
	1200	-	+	+	-	+	-	-
	1100	-	+	-	-	-	-	-
	1000	-	+	+	-	+	-	-
	800	+	-	+	+	-	-	-
	700	-	+	-	-	-	-	-
	550	+	-	+	+	-	-	-
	300	-	+	+	-	+	-	-
	Σ pita DNA	4	6	7	4	3	0	0
		(%)			57.14	42.86	0	0
2	OPA-13, GAAACGGGTG							
	Ukuran pita (bp)							
	1100	+	+	+	-	-	+	-
	1000	+	-	+	+	-	-	-
	700	+	-	+	+	-	-	-
Σ pita DNA	3	1	3	2	0.00	1	0	
	(%)				66.67	0	33.33	0
3	OPA-07, GAAACGGGTG							
	Ukuran pita (bp)							
	1800	-	+	+	-	+	-	-
	1200	+	+	+	-	-	+	-
	1100	-	+	+	-	+	-	-
	900	+	+	+	-	-	+	-
	800	+	-	+	+	-	-	-
	700	-	+	+	-	+	-	-
	650	+	-	+	+	-	-	-
	600	-	+	-	-	-	-	-
	500	+	-	+	+	-	-	-
	300	-	+	+	-	+	-	-
	250	+	-	-	-	-	-	-
	Σ pita DNA	6	7	9	3	4	2	0
	(%)				33.33	44.45	22.22	0
4	OPB-18, CCACAGCAGT							
	Ukuran pita (bp)							
	1800	+	+	+	-	-	+	-
	1100	+	+	+	-	-	+	-
	1000	-	+	+	-	+	-	-
	800	+	+	+	-	-	+	-
	550	-	+	+	-	+	-	-
	450	+	+	+	-	-	+	-
	1	2	3	4		5		6
	350	+	-	+	+	-	-	-
	300	-	+	-	-	-	-	-
	250	+	-	-	-	-	-	-
	Σ pita DNA	6	7	7	1	2	4	0
					14.28	28.58	57.14	0
Total pita DNA		19	21	26	10	9	7	0
			(%)		38.46	34.62	26.92	0.00



Gambar 4. Hasil flowcytometer hibrid Pisang Madu x *Musa acuminata* var *malaccensis* yang menunjukkan peak pada channel 300 (triploid)



Gambar 5. Profil pita DNA hibrid pisang dan kedua tetuanya dengan primer OPA-07, OPA-13, OPB-07 dan OPB-18.

Keterangan: M = 100 DNA ladder plus (Fermentas), 1 = Pisang Madu (4x), 2 = *Musa acuminata* var *malaccensis* (2x), 3 = Hibrid

Crouch (1997) yang menunjukkan hasil persilangan buatan antara pisang tetraploid dengan diploid berkisar antara 30-88%.

Pada penelitian ini penggunaan pisang tetraploid sebagai tetua betina dan pisang diploid sebagai tetua jantan menghasilkan hibrid triploid dengan prosentase yang tinggi yaitu 100%. Tingginya persentase hibrid triploid ini juga dilaporkan Osebele *et al* (2006), sedangkan kombinasi sebaliknya, pisang

diploid sebagai tetua betina dan tetraploid sebagai tetua jantan, menghasilkan keturunan triploid hanya 3,8% (Osebele *et al.* 2006). Hasil ini menunjukkan bahwa prosedur persilangan antara betina tetraploid dengan jantan diploid efektif untuk menghasilkan pisang hibrid triploid.

Pada penelitian ini sembilan dari 15 kombinasi persilangan tidak menghasilkan biji sama sekali. Semua faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan biji dari persilangan melibatkan genotip dan

Tabel 5. Tingkat ploidi tetua betina dan jantan serta pisang hibrid hasil persilangan

No	No Akses	Mean	CV(%)	Tingkat ploidi
Pisang Madu (tetua ?)				
1	I 8A#1	381.89	7.34	4x
2	I 8A#2	402.68	7.20	4x
3	I 8A#3	409.34	3.95	4x
<i>Musa acuminata</i> var <i>malaccensis</i> (tetua ?)				
1	I 20B#2	171.02	7.17	2x
2	I 20B#4	189.53	5.53	2x
3	I 20B#5	179.0	7.0	2x
Hibrid Pisang Madu x <i>Musa acuminata</i> var <i>malaccensis</i>				
1	III 11B#1	333.94	6.29	3x
2	III 11B#2	288.17	5.70	3x
3	III 11B#3	276.43	7.90	3x
4	III 16B#1	286.25	8.35	3x
5	III 16B#2	321.84	7.84	3x
6	III 16B#3	299.93	4.89	3x
7	III 16B#4	358.92	3.35	3x
8	III 16B#5	318.80	4.41	3x
9	III 17C#1	304.82	6.05	3x
10	III 17C#2	318.74	5.90	3x
11	III 17C#3	291.22	6.37	3x
12	III 17C#4	247.10	6.58	3x
13	III 17C#5	327.11	6.05	3x

kondisi lingkungan yang sama dengan kombinasi persilangan lainnya. Penjelasan yang mungkin adalah bervariasinya kemampuan polen *Musa acuminata* var *malaccensis* untuk membentuk *pollen tube* yang normal. Karena tidak semua polen *Musa acuminata* var *malaccensis* menghasilkan *pollen tube* yang normal, dan persentase kecambah polen (*pollen tube*) yang normal relatif sangat rendah dibandingkan dengan jumlah polen yang dihasilkan (data tidak ditampilkan).

Rendahnya embrio hibrid yang tumbuh dan berkembang menghambat keberhasilan persilangan. Perkem-

baran 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 (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 12 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. Penelitian mengenai pengaruh berbagai konsentrasi nutrisi (hara makro dan BA, biotin, organik nitrogen, dan sumber karbon) terhadap perkecambahan embrio beberapa varietas *Musa acuminata* sedang dilakukan oleh team peneliti ini.

Penampilan morfologi tanaman pisang hibrid

Penampilan morfologi tanaman pisang hibrid disajikan pada Tabel 2, dan beberapa karakter disajikan dengan foto (Gambar 2 dan 3). Secara umum 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 (Foto 1b) lebih menyerupai

tetua betina Pisang Madu tetraploid (Foto 1a), dibandingkan dengan tetua jantan diploid *Musa acuminata* var *malaccensis* yang memiliki habitus tegak (Gambar 1c.). Demikian juga warna batang semu hibrid ini merupakan gabungan dari kedua tetuanya, tetapi lebih dominan menyerupai tetua betina, dibandingkan dengan tetua jantan yang memiliki batang semu yang hijau (Gambar 2A1, 2B1, 2C1). Getah *pseudostem* keruh seperti susu, lebih menyerupai tetua betinanya dibandingkan dengan tetua jantan yang memiliki getah jernih seperti air (Gambar 2A2, 2B2, 2C2).

Beberapa karakter morfologi lainnya pada tanaman hibrid, seperti lapisan lilin pada lembaran daun, warna permukaan daun, 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 lebih menyerupai tetua jantannya (Gambar 2A6, 2B6, 2C6).

Penampilan Karakter Agronomi Hibrid

Uji-T dilakukan terhadap lima karakter agronomis hibrid yang meliputi bobot tandan, tinggi tanaman, panjang dan lebar daun, serta diameter batang. Bobot tandan dan panjang daun hibrid tidak berbeda nyata dengan tetua betina, Pisang Madu tetraploid, tetapi sangat berbeda nyata dengan tetua jantannya, *Musa acuminata* var *malaccensis*. Tinggi tanaman pisang hibrid berbeda nyata dengan tetua betina, tetapi tidak berbeda nyata dengan tetua jantannya.

Sedangkan pada karakter diameter batang dan lebar daun tanaman hibrid sangat berbeda nyata dengan kedua tetuanya. Secara umum karakter agronomis hibrid merupakan gabungan kedua tetuanya.

Analisis hibrid pisang dengan marka RAPD (*random amplified polymorphic DNA*)

Pada penelitian ini pita DNA pada hibrid kebanyakan disumbang dari tetua betina (38.46%), diikuti oleh tetua jantan (34.62) dan kedua tetuanya (26.92%). Pada penelitian ini, hanya 2 (10.53%) pita DNA dari tetua betina dan 5 (23.81%) pita DNA dari tetua jantan tidak ditemukan pada tanaman hibrid yang diteliti. Sumber polimorfisme pada analisa RAPD dapat disebabkan adanya perubahan basa dalam sekuens situs penempelan primer, delesi pada situs penempelan, delesi dan insersi yang mengubah ukuran fragmen DNA yang menghambat amplifikasinya. Perbedaan marka pita pada tetua dan keturunannya dapat disebabkan oleh hasil rekombinasi DNA, mutasi atau segregasi random kromosom saat meiosis selama proses hibridisasi (Huchett and Botha, 1995).

Berdasarkan hasil penelitian ini, secara keseluruhan kontribusi/transmisi pita-pita DNA dari kedua tetuanya sesuai dengan prinsip rekombinasi dan segregasi Mendel.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa marka RAPD (OPA-07, OPA-13, OPB-07 dan OPB-18) dapat digunakan untuk verifikasi kontribusi gen inti dari kedua tetua terhadap hibridnya, seperti yang terlihat pada profil RAPD

hibrid yang memiliki pola profil pita DNA yang komplemen dengan kedua tetuanya. Verifikasi hibrid dengan RAPD juga digunakan Grosser *et al.* (2007) dalam verifikasi somatic hibrid pumelo, dan Chundet *et al.* (2007) dalam verifikasi hibrid lychee.

Identifikasi tingkat ploidi hibrid dengan Flowcytometer

Hasil identifikasi tingkat ploidi menunjukkan semua tanaman hibrid yang diuji menunjukkan tanaman triploid dengan *peak* pada channel 300) (Gambar 4), dengan rata-rata kandungan DNA (mean) hibrid berkisar antara 247.10-358.92 dengan coefficient of variation (CV) antara 3.35-8.35 (Tabel 5).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa produksi biji pisang hibrid hasil persilangan Pisang Madu tetraploid dengan pisang liar diploid *Musa acuminata* var *malaccensis* relatif tinggi (53.97%). Namun hanya 48.46% yang mengandung embrio dan hanya 1.27% embrio yang tumbuh dan berkembang. Rendahnya embrio yang tumbuh dan berkembang perlu diteliti lebih lanjut. Tanaman hibrid memiliki bobot tandan dan panjang daun tidak berbeda nyata dengan tetua betina, Pisang Madu tetraploid, tetapi sangat berbeda nyata dengan tetua jantannya, *Musa acuminata* var *malaccensis*. Tinggi tanaman pisang hibrid berbeda nyata dengan tetua betina, tetapi tidak berbeda nyata dengan tetua jantannya. Sedangkan

pada karakter diameter batang dan lebar daun tanaman hibrid sangat berbeda nyata dengan kedua tetuanya. Tanaman hibrid memiliki profil DNA yang diturunkan dari tetua betina (38.46%), diikuti oleh tetua jantan (34.62) dan kedua tetuanya (26.92%). Semua tanaman hibrid memiliki tingkat ploidi triploid (3x) yang diidentifikasi dengan Flowcytometer.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terselenggara atas bantuan dana Pusat Penelitian Biologi – LIPI melalui Kegiatan Kompetitif Sub Program Eksplorasi dan Pemanfaatan terukur Sumber Daya Hayati (Darat dan Laut) Indonesia Tahun 2009-2011. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Katarina Utami Nugrahani SP, Nuriyanto SSi, Desy Sukmawati SP, Dian Hapsari Ekaputri SP, Nurmansyah SP, Agus Setyo Yudhanto SP, Herlina, Ajat Sudrajat, Nenah, Dian, yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Asif MJ, C Mak and RY Othman. 2001. Chundet R, Cutler RW, Tasanon M, and Anuntalabhochai S. 2007. Hibrid detection in Lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers. Science Asia 33:307-311. Available on line at http://www.scienceasia.org/2007.33.n3/v33_307_311.pdf
- Grosser JW, Chandler JL and Duncan LW. 2007. Production of mandarin + pummelo somatic hibrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/ resistance to sting nematode. Sci. Horticult. (2007), doi:10.1016/j.scienta.2007.01.033. Available online at <http://hnavl.hzau.edu.cn/kech/ssyy/qysd/njsl/22.pdf>
- Huchett BI and Botha FC (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 Development. Montpellier. France.
- Nasution RE. 1991. *A taxonomic study of the Musa acuminata Colla with its intraspecific Taxa in Indonesia*. Memoirs of the Tokyo University of Agriculture 32:1-122.
- Ortiz R. 1997. Secondary polyploids, heterosis, and evolutionary crop breeding for further improvement of the plantain and banana genome. *Theor. Appl. Gen.* 94: 1113-1120.
- Ortiz R and 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 and D Vuylsteke. 1995. Factors influencing seed set in triploid *Musa* spp.L. and production of euploid hibrids. *Ann. Bot.* 75: 151-155.

- Ortiz, R., Vuylsteke, D.R., Crouch, H.K. and Crouch, J.H. 1998a. TMP3x: triploid black sigatoka resistant *Musa* hybrid germplasm. *HortScience* 33:362-365.
- Ortiz R, F Ulburgh, and JU Okoro. 2008b. Seasonal variation of apparent male fertility and 2n pollen production in plantain and banana. *HortScience* 33(1):146-148.
- Osebele OH, A Tenkouano and M Pillay. 2006a. Ploidy variation of *Musa* hibrids from crosses. *African J. Biotechnology* 5(11):1-48-1-53
- Osebele OH, A Tenkouano and M Pillay, IU Obi, and MI Uguru. 2006b. Ploidy and genome segregation in *Musa* breeding populations assessed by Flow Cytometry and Randomly Amplified Polymorphic DNA markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131(6): 780-786.
- Raboin LM, Carreel F, Noyer JL, baurens FC, Horry JP, Bakry F, Tezenas du Montcel, Ganry J, Lanaud C & Lagoda PJL. 2—5. Diploid ancestors of triploid export banana cultivars: molecular identification of 2n restitution gamete donors and n gamete donors. *Mol Breeding* 16:333-341
- Sedgley M and Harbard J, 1993. Pollen storage and breeding system in relation to controlled Pollination of four species of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae), *Aust. J. Bot.* 1993, 41,6-1- 6-9.
- Ssebuliba RN, A Tenkouano and M Pillay. 2—8. Male fertility and occurrence of 2n gametes in East African Highland bananas (*Musa* spp.). *Euphytica* 164:53-62.
- Stover RH & Buddenhagen IW. 1986. Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41:175-191
- Stover RH & Simmonds NW. 1987. *Bananas*. Longman Sci & Technical, Essex, England. 3rd Edition.
- Vuylsteke DR, Swennen RL, Ortiz R. 1993. Development and performance of black sigatoka-resistant tetraploid hibrids of plantain (*Musa* spp., AAB group). *Euphytica* 65: 33–42.
- Williams, JG, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalsky and SV Tingev. 199-. DNA plolymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.* 18(22):6531-6535.

Memasukkan: Agustus 2011

Diterima: Januari 2012