

Identifikasi Morfologi dan Marka Molekuler Terpaut Sifat Tidak Berbunga Jantan Pada Mutan Pisang Kepok (*Identification of Morphological and Molecular Markers Related to Male Budless Trait On Kepok Banana Mutant*)

Naipospos, N¹⁾, Miftahudin²⁾, dan Sobir³⁾

¹⁾Program Studi Biologi Tumbuhan, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB-Dramaga, Bogor 16680

²⁾Departemen Biologi, Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB-Dramaga, Bogor 16680

³⁾Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB-Dramaga, Bogor 16680 dan Pusat Kajian Hortikultura Tropika IPB
E-mail : nettyani.naipospos@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 16 Juli 2013 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 18 Februari 2014

ABSTRAK. Salah satu masalah dalam pengembangan produksi pisang ialah penyakit darah. Infeksi penyakit ini dapat dikurangi dengan menanam pisang kepok mutan tidak berbunga jantan. Penerapan teknik kultur jaringan dapat menyediakan benih seragam secara cepat dan dalam waktu yang singkat. Namun, penggunaan teknik kultur jaringan dapat menginduksi variasi somaklonal. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang stabilitas genetik dan keseragaman morfologi pada benih hasil kultur jaringan. Penelitian dilakukan dari Bulan Agustus 2012 sampai Mei 2013. Identifikasi morfologi pisang dilaksanakan di Kebun Koleksi PKHT Ciomas, Bogor. Analisis molekuler dilaksanakan di Laboratorium Molekuler PKHT. Penelitian bertujuan mempelajari karakter morfologi mutan pisang kepok Unti Sayang tidak berbunga jantan dan mengidentifikasi marka molekuler terpaut sifat tidak berbunga jantan. Identifikasi karakter morfologi dari 24 sampel tanaman dilakukan menggunakan panduan deskriptor dari *International Plant Genetic Research Institute*. Identifikasi marka molekuler dilakukan berdasarkan teknik PCR, menggunakan 20 primer RAPD, 12 primer ISSR, serta primer gen *Pistillata*, dan *Agamous* yang didesain berdasarkan informasi *database* sekuen DNA *Musa acuminata* yang terdapat di *gene bank*. Hasil pengamatan menunjukkan tidak ada variasi morfologi antara tipe liar, tanaman mutan, dan tanaman mutan yang kembali berbunga jantan, kecuali ada atau tidaknya bunga jantan. Analisis PCR dari 24 sampel tanaman menggunakan 20 primer RAPD dan 12 primer ISSR berturut-turut menghasilkan 379 dan 216 pita yang seragam. Hal yang sama juga ditemukan dari hasil amplifikasi DNA menggunakan primer *Pistillata* dan *Agamous* yang menghasilkan pita tunggal pada semua sampel. Analisis sekuen fragmen PCR hasil amplifikasi dengan primer gen *Pistillata* menunjukkan terdapat tiga nukleotida yang berbeda antara tipe liar dan tanaman mutan yang kembali berbunga jantan pada posisi 445, 461, dan 507.

Katakunci: ISSR; Mutan tidak berbunga jantan; *Musa* spp.; *Pistillata*; RAPD

ABSTRACT. Bacterial blood disease is one of the main disease in kepok banana. Male budless banana mutant could be cultivated in order to overcome the disease problem. The mutant could be propagated both using plant tissue culture and suckers approaches. However, genetic stability of the mutant produced from both approach has been considered as a problem. Morphological homogeneity and genetic stability is an important issue in mass propagation system of banana. Experiment conducted from August 2012 until May 2013. Banana morphological identification conducted at collection from Center for Tropical Horticulture Studies, Ciomas, Bogor. Molecular analysis conducted at Molecular Laboratory of Center For Tropical Horticulture Studies. Therefore, morphological characterization of male budless banana mutant Unti Sayang and molecular markers identification related to the trait need to be performed and reported in this report. Morphological characterization of 24 banana mutant was performed based on the Plant Genetic Research Institute descriptor. Identification of molecular markers was carried out based on PCR technique using 20 RAPD, 12 ISSR and *Pistillata* and *Agamous* primers that were designed based on gene bank sequence database of *Musa acuminata*. The morphological observation showed that there was no variation among wild type, mutant, and revertant mutant, except the presence and absence of male bud flower. All the 20 RAPD and 12 ISSR primers screened produced 379 and 216 non polymorphic bands, respectively. In addition, DNA amplification using primer developed from *Pistillata* and *Agamous* genes also produced non polymorphic single band for all sampel analysed. However, sequence analysis of PCR fragment produced from *Pistillata*-developed primers showed three single nucleotide polymorphism between wild type and revertant mutant at position of 445, 461, and 507.

Keywords: ISSR; Male budless mutant; *Musa* spp.; *Pistillata*; RAPD

Pisang (*Musa* spp.) merupakan buah yang paling banyak dikonsumsi untuk memenuhi kebutuhan gizi dan pangan. Pisang mendapat prioritas pengembangan dari Kementerian Pertanian untuk mengisi kebutuhan domestik maupun ekspor. Salah satu kendala pengembangan tanaman pisang ialah serangan penyakit darah (*blood disease*) yang disebabkan

oleh *blood disease bacterium* (BDB). Penyakit darah ditularkan dan disebarkan oleh serangga pengunjung bunga (Rustam 2005). Penyakit BDB lebih banyak menyerang tipe *plantain*, seperti pisang kepok (genom ABB). Tanaman pisang mudah terserang BDB karena bunga jantannya mudah dikunjungi serangga karena mengandung gula yang tinggi. Bunga jantan juga

memiliki fase pembentukan yang terbuka dan tidak dilindungi oleh daun pelindung (*braktea*), sehingga menjadi bukaan alami bagi BDB. Gejala yang terlihat ialah apabila buah dipotong, maka bagian dalam buah tampak berwarna merah kecoklatan atau menjadi busuk berlendir (Hadiwiyono 2011). Penyakit darah pertama kali dilaporkan sejak 80 tahun yang lalu di Sulawesi. Pada tahun 1980 menyebar ke Jawa. Akhir tahun 1990, penyakit darah menyebabkan penurunan produksi pisang di Kalimantan secara drastis dan sekarang diketahui menyebar di Sumatera (Sobir *et al.* 2008).

Penyakit darah dapat diatasi dengan menghasilkan pisang yang tidak berbunga jantan (Sobir *et al.* 2008). Bunga jantan kurang berperan untuk pembentukan buah, karena buah dapat terbentuk tanpa adanya fertilisasi (partenokarpi). Pusat Kajian Hortikultura Tropis (PKHT) Institut Pertanian Bogor (IPB) telah mengoleksi beberapa pisang kepok mutan alami, diberi nama Unti Sayang (US-1) tidak berbunga jantan (*male budless mutant*) yang berasal dari Sulawesi. Buah pisang ini bermutu baik, enak dimakan, produksi buah tinggi, dan tahan terhadap penyakit darah (Sobir *et al.* 2008). Mutan diperbanyak dengan kultur jaringan sampai generasi subkultur keenam dan telah ditanam di kebun koleksi, tetapi stabilitas genetik dari pisang ini belum diketahui. Skirvin *et al.* (1993) menyatakan banyaknya subkultur dapat menyebabkan terjadinya variasi somaklonal, dimana banyaknya subkultur diperkirakan dapat menginduksi munculnya fenotip berbunga jantan kembali (mutasi balik). Karakterisasi sifat dapat dilakukan melalui identifikasi morfologi dan genetik, sehingga diharapkan mampu mendeteksi adanya abnormalitas secara dini pada tingkat DNA. Informasi tersebut juga bermanfaat untuk menentukan banyaknya subkultur yang dapat digunakan untuk perbanyakan pisang kepok Unti Sayang, sehingga bermanfaat dalam usaha pemuliaan tanaman.

Identifikasi melalui pendekatan morfologi mudah berubah, karena karakter morfologi dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga diperlukan analisis molekuler menggunakan *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) dan *inter simple sequence repeats* (ISSR) untuk mengetahui perubahan genetik. Marka RAPD juga telah digunakan untuk menganalisis integritas genetik planlet pisang dari kultur *in vitro* (Mathius & Hutabarat 1997). Marka ISSR umumnya digunakan untuk mengetahui adanya penyimpangan genetik, hubungan kedekatan secara genetik ataupun variasi genetik yang ada (Kumar *et al.* 2006). Tidak terbentuknya bunga jantan diduga berhubungan dengan berfungsi atau tidaknya gen *Pistillata* (PI) yang terkait dalam pembentukan *stamen* dan gen *Agamous* (AG) pada pembentukan *karpel*. Adam *et al.* (2007) menemukan adanya abnormalitas pada kelapa

sawit yang menyebabkan sterilitas dikendalikan oleh gen *AG2* yang mengontrol identitas bunga jantan dan betina. Oleh karena itu, digunakan juga gen *Pistillata* dan *Agamous* yang dirancang berdasarkan informasi yang tersedia di *gene bank*. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi karakter morfologi, marka ISSR, dan RAPD serta marka yang dikembangkan dari gen *Pistillata* dan *Agamous* yang terpaut sifat tidak berbunga jantan pada mutan pisang kepok Unti Sayang. Hipotesis penelitian ini ialah (1) tidak terdapat perbedaan morfologi secara umum antara pisang Kepok tipe liar, mutan tidak berbunga jantan, dan mutan yang kembali berbunga jantan dan (2) terdapat pola pita DNA yang berbeda antara tanaman yang tidak berbunga jantan dengan tanaman yang kembali berbunga jantan.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan dari Bulan Agustus 2012 sampai Mei 2013. Identifikasi morfologi pisang dilaksanakan di Kebun Koleksi PKHT Ciomas, Bogor. Analisis molekuler dilaksanakan di Laboratorium Molekuler PKHT.

Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan ialah mutan pisang kepok Unti Sayang. Jumlah bahan tanaman yang digunakan sebanyak 24 tanaman dari hasil subkultur 1 sampai 6, serta satu tanaman pisang yang kembali berbunga jantan dari perbanyakan anakan dan tipe liarnya yaitu pisang kepok Kuning.

Primer yang digunakan sebanyak 32 primer yang diperoleh dari PKHT (Tabel 1 dan Tabel 2), terdiri atas 20 primer RAPD dan 12 primer ISSR. Dua pasang primer yang dikembangkan dari sekuen gen *Pistillata* (PI) dan *Agamous* (AG) dari *Musa acuminata* menggunakan program *primer3* (<http://frodo.mit.edu>) juga digunakan dalam penelitian ini (Tabel 3).

Identifikasi Morfologi

Identifikasi morfologi menggunakan panduan deskriptor pisang dari *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI 1996). Identifikasi meliputi karakter batang semu, tangkai daun, daun, bunga, dan buah.

Isolasi DNA dan Teknik PCR

Isolasi DNA mengikuti prosedur CTAB (Doyle & Doyle 1987) dengan modifikasi, yaitu menaikkan konsentrasi CTAB dari 2% menjadi 10% dan dengan penambahan *polyvinil phenolphthalein* (PVP) dan *-mercaptanol* pada saat awal penggerusan (Couch & Fritz 1990).

Tabel 1. Primer ISSR yang digunakan untuk amplifikasi PCR (ISSR primer used to PCR amplification)

Nama primer (Name of primer)	Sekuen (Sequence 5'-3')	Penempelan (Annealing), °C
PKBT-1	(AC) ₈ TG	54
PKBT-2	(AC) ₈ TT	53
PKBT-3	(AG) ₈ T	53
PKBT-4	(AG) ₈ AA	53
PKBT-5	(AG) ₈ TA	53
PKBT-6	(AG) ₈ TT	53
PKBT-7	(GA) ₉ A	53
PKBT-8	(GA) ₉ C	54
PKBT-9	(CTC) ₅ GC	54
PKBT-10	(GT) ₉ A	54
PKBT-11	(GT) ₉ C	54
PKBT-12	(GT) ₉ T	54

Tabel 2. Primer RAPD yang digunakan untuk amplifikasi PCR (RAPD primer used to PCR amplification)

Nama primer (Primer name)	Sekuen (Sequence 5'-3')	Suhu penempelan (Annealing temperature), °C
OPA 1	CAG GCC CTT C	36
OPA 2	TGC CGA GCT G	36
OPA 3	AGT CAG CCA C	36
OPA 4	AAT CGG GCT G	36
OPA 7	GAA ACG GGT G	36
OPA 8	GTG ACG TAG G	36
OPA 9	GGG TAA CGC C	36
OPA 11	CAA TCG CCG T	36
OPA 12	TCG GCG ATA G	36
OPA 13	CAG CAC CCA C	36
OPA 15	TTC CGA ACC C	36
OPA 16	AGC CAG CGA A	36
OPA 17	GAC CGC TTG T	36
OPA 18	AGG TGA CCG T	36
OPA 19	CAA ACG TCG G	36
OPJ 4	CCG AAC ACG G	36
OPJ 9	TGA GCC TCA C	36
OPJ 11	ACT CCT GCG A	36
OPJ 13	CCA CAC TAC C	36
OPJ 16	CTG CTT AGG G	36

Tabel 3. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen PI dan AG (Primer used to amplification PI and AG gene)

Primer (Primer)	Sekuen primer (Primer sequence), 5'-3'	Penempelan (Annealing), °C	% GC	Ukuran produk PCR (PCR product size)
PI	F: GCAAGA TGT CGG AGT ACT GCA	65	52,4	500-750 pb
	R: CTC CTT GGG GTT GAG TGA GTT	65	52,4	
AG	F: GGG GTAAGA TTG AGA TCAAGA G	58	45,5	500-750 pb
	R: TGA GCT GCT GCC TCC AAT ATG T	58	50,0	

PI = *Pistillata*; AG = *Agamous*; F = *Forward*; R = *Reverse*

Amplifikasi PCR mengikuti metode Kurokawa *et al.* (2003). Amplifikasi menggunakan mesin PCR (*Applied Biosystem USA*) sebanyak 35 siklus setelah pra-denaturasi selama 4 menit 94°C. Setiap siklus terdiri atas 30 detik 94°C denaturasi, 30 detik annealing (36-65°C), 1 menit pada 72°C elongasi dan elongasi akhir 5 menit pada 72°C. Fragmen DNA hasil amplifikasi dielektroforesis selama 47 menit pada tegangan 50 volt bersama DNA standar 1 kb DNA ladder (*Promega USA*) pada gel agarose 1,2%. Selanjutnya gel divisualisasi dengan cara direndam dalam *etidium bromida* 10% selama 15 menit dan dibilas dengan akuades. Pola pita hasil amplifikasi didokumentasi menggunakan alat dokumentasi gel.

Analisis Sekuen DNA

Analisis sekuen basa fragmen PCR hasil amplifikasi dengan primer dari gen *PI* dan *AG* dilakukan dua arah, yaitu *forward* dan *reverse* pada tiga sampel DNA hasil amplifikasi. Amplikon hasil amplifikasi PCR kemudian dikirim ke perusahaan penerima jasa sekuen. Hasil sekuen DNA dianalisis menggunakan program *BLAST-N* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), *ClustalX 2.1* (Thompson *et al.* 1997), *TextPad 4.0*, *Genetyx Win 4.0* dan *MEGA 5.0* (Tamura *et al.* 2011). Analisis tersebut bertujuan untuk membandingkan susunan sekuen basa DNA yang terdapat pada database dengan tanaman pisang tipe liar, mutan tidak berbunga jantan (*male budless mutant*), dan mutan yang kembali berbunga jantan (*revertrant mutant*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakter Morfologi Mutan Pisang Kepok Unti Sayang

Hasil identifikasi terhadap semua karakter morfologi ditemukan adanya tanaman yang memunculkan fenotip berbunga jantan kembali (*revertrant mutant*), yaitu dari subkultur enam serta dari perbanyakan anakan (Tabel 4).

Munculnya *revertrant mutant* diduga berhubungan dengan stabilitas klonal. Stabilitas klonal ialah faktor yang sangat penting dalam perbanyakan *in vitro* secara komersial. Variasi somaklonal yang terdapat pada tanaman hasil kultur *in vitro* bisa disebabkan karena meningkatnya frekuensi terjadinya aberasi kromosom yang disebabkan oleh patahnya ikatan kromosom, pertukaran basa tunggal, perubahan dalam jumlah kopi urutan basa yang berurutan dan perubahan dalam pola metilasi DNA yang menyebabkan munculnya variasi akibat epigenetik (Kaeppler *et al.* 2000). Variasi somaklonal dapat disebabkan oleh jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan kedalam medium, tipe regenerasi, kultivar atau klon

yang digunakan, sumber eksplan, umur kultur, frekuensi subkultur, dan lingkungan kultur (Karp 1995).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan ialah dari dua kelompok sitokinin yaitu turunan adenine yaitu BAP dan turunan fenilurea yaitu TDZ. Konsentrasi BAP yang digunakan sebesar 0,08 ppm dan konsentrasi TDZ yang digunakan sebesar 2 ppm. BAP dan TDZ mempunyai respons fisiologi yang sama yaitu berperan dalam regulasi pembelahan sel serta diferensiasi dan pertumbuhan jaringan. Penggunaan ZPT sitokinin dalam konsentrasi yang tinggi dapat berpengaruh negatif karena dapat meningkatkan frekuensi tanaman regenerasi tumbuh abnormal akibat tingginya kecepatan multiplikasi.

Beberapa kultivar dalam satu spesies tanaman juga dapat menunjukkan tingkat variasi yang berbeda ketika diperbanyak secara *in vitro*. Terdapat kultivar yang menunjukkan variasi yang berlebihan, sedangkan yang lainnya stabil. Pada pisang kepok Tanjung menunjukkan perubahan bentuk helaian daun akibat adanya sifat *male budless*, pada pisang Cavendish terjadi abnormalitas berupa kekerdilan yang mencapai 70% dan terus terbawa hingga beberapa siklus perbanyakan vegetatif. Pada mutan pisang kepok Unti Sayang *male budless* menunjukkan adanya *revertrant mutant* akan tetapi tidak menyebabkan perubahan pada karakter morfologi yang lain. Munculnya *revertrant mutant* diduga disebabkan oleh adanya perubahan susunan olionukleotida pada untai DNA yang terjadi secara acak dan berbeda untuk masing-masing tanaman.

Tingginya subkultur hingga subkultur ke-6 diduga menyebabkan ketidakseimbangan metabolisme dari tanaman, sehingga menginduksi munculnya variasi somaklonal yaitu ditemukannya *revertrant mutant*. Subkultur dilakukan untuk meningkatkan kecepatan multiplikasi. Akan tetapi, jika subkultur dilakukan secara berlebihan, maka juga dapat menginduksi variasi (Skirvin *et al.* 1994). Eksistensi keragaman genetik diduga berhubungan dengan kestabilan jaringan dari genotip pisang tersebut untuk merespons perlakuan didalam kultur. Subkultur dapat dilakukan terus menerus tetapi dengan bertambahnya umur kultur, maka subkultur menjadi kurang responsif dan muncul ketidakstabilan genetik, sehingga subkultur harus dibatasi. Cote *et al.* (1993) menemukan bahwa pada pisang cavendish subkultur maksimal dilakukan 10 kali. Tregear *et al.* (2002) juga menemukan adanya abnormalitas yang terjadi pada bibit kelapa sawit hasil kultur jaringan dengan beberapa kali subkultur, dimana bunga kelapa sawit *stamen* dan *staminodes* berubah menjadi struktur buah semu (buah mantel), sehingga menyebabkan sterilitas dan abnormalitas yang bersifat epigenetik. Phillips *et al.* (1994) menemukan bahwa

Tabel 4. Perbedaan karakter morfologi bunga jantan pada pisang kepok Unti Sayang (US-1) (*The different of morphological male bud character on kepok banana Unti Sayang (US-1)*)

Karakter (Characters)	Pisang Kepok Kuning (Kepok Kuning banana)	Tidak berbunga jantan (Male budless)	Kembali berbunga jantan (Male re-bud)	
Asal perbanyakan (Multiplication source)	Anakan (Suckers)	Subkultur 1 dan 4 (Subculture 1 and 4)	Subkultur 6 (Subculture 6)	Anakan (Suckers)
Panjang tangkai tandan (Peduncle pedicel length)	± 60 cm	± 63 cm	56 cm	60 cm
Panjang tandan (Peduncle length)	± 100 cm	100-113 cm	110 cm	115 cm
Jumlah sisir/tandan (Number of bunch/peduncle)	6-7	6-8	5	7
Jumlah buah/sisir (Number of fruit/set)	13-16	13-16	≥17	≥20
Jarak antarsisir buah (Distance among bunch)	± 12 cm	± 16 cm	8 cm	12 cm
Bunga jantan (Male bud)	Tetap (Persistent)	Hilang (Budless)	Tetap (Persistent)	Tetap (Persistent)

tanaman yang beregenerasi dari kultur kalus yang relatif tidak berdiferensiasi menyebabkan kemungkinan terjadinya perubahan genetik yang sangat besar.

Marka Molekular Terpaut Sifat Tidak Berbunga Jantan

Amplifikasi DNA menggunakan 20 primer RAPD menghasilkan 101 pita DNA dengan ukuran berkisar antara 250–1.250 pb. Jumlah pita yang dihasilkan per primer bervariasi, mulai dari dua pita (OPA 9, OPA 12 dan OPJ 16) sampai sembilan pita (OPA 2 dan OPA 7). Amplifikasi DNA menggunakan 12 primer ISSR menghasilkan 52 pita DNA dengan ukuran berkisar antara 250-1.750 pb. Jumlah pita yang dihasilkan per primer juga bervariasi, mulai dari tiga pita (PKBT 5 dan PKBT 11) sampai tujuh pita (PKBT 2 dan PKBT 3). Semua pita DNA yang dihasilkan merupakan pita monomorfik untuk semua sampel hasil subkultur serta anakan (Gambar 2, 3, dan 4).

Primer-primer yang digunakan belum dapat menunjukkan adanya variasi genetik atau belum terpaut dengan sifat *male budless*. Hasil amplifikasi DNA dari tanaman yang telah di subkultur sebanyak enam kali tidak menunjukkan pola pita yang berbeda, begitu juga dengan tanaman yang berasal dari anakan serta tipe liarnya. Pita DNA yang monomorfik menunjukkan tidak adanya variasi genetik yang dihasilkan dari primer. Lakshmanan *et al.* (2007) menganalisis kestabilan genetik tanaman pisang menggunakan 30 primer RAPD serta lima primer ISSR dan menghasilkan pola pita DNA monomorfik, di mana tidak terdapat pola pita yang berbeda antara tanaman induk dengan tanaman yang diperbanyak dengan kultur jaringan meskipun terdapat variasi morfologi.

Pasangan basa DNA yang digunakan pada primer sangat beragam, tetapi tidak ditemukan pita pembeda spesifik yang mampu membedakan antara mutan tidak berbunga jantan dan mutan yang kembali berbunga jantan dari hasil perbanyakan kultur jaringan dan anakan yang dapat digunakan sebagai pembeda secara universal.

Beberapa peneliti melaporkan semakin banyak jumlah primer yang digunakan, semakin rendah nilai koefisien keragaman hasil analisis yang diperoleh. Sepuluh sampai 20 primer dianggap sudah mencukupi untuk keperluan analisis, karena dengan 10 primer pengaruh kesalahan percobaan telah dapat diperkecil hingga mendekati nol. Analisis menggunakan 200 karakter RAPD telah dapat memberikan hasil analisis yang dapat dipercaya (Andebrhan & Furtek 1994).

Mathius *et al.* (2001) menggunakan penanda RAPD untuk menganalisis genotip normal dan abnormal, dari hasil yang diperoleh tidak ada satupun pita DNA dari 15 primer yang mencirikan abnormalitas pada semua klon yang diuji. Selain itu, Mathius *et al.* (2005) menggunakan 20 primer AFLP untuk menganalisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit. Primer yang digunakan menghasilkan 264 pita DNA, akan tetapi tidak ditemukan pita pembeda spesifik yang dapat membedakan antargenotip normal, abnormal atau berbunga jantan, variasi ini diduga erat hubungannya dengan pola metilasi DNA yang bersifat epigenetik. Selain itu, pola pita DNA monomorfik yang dihasilkan dari keseluruhan primer kemungkinan disebabkan karena adanya beberapa perubahan genetik yang tidak dapat terdeteksi seperti adanya mutasi titik di luar situs penempelan primer. Hal yang sama juga ditemukan Mathius *et al.* (2001) yang tidak menemukan adanya



Gambar 1. Hilangnya bunga jantan pada pisang kepok Unti Sayang (US-1). A=mutan tidak berbunga jantan, B=mutan kembali berbunga jantan, 1=munculnya bunga jantan, 2=terbukanya braktea, 3=jatuhnya braktea, 4A=tidak ada bunga jantan yang tersisa, 4B=bunga jantan tersisa pada bagian ujung (*The loss of male bud on kepok banana Unti Sayang (US-1). A=male budless mutant, B=revertrant mutant, 1=appearance of male bud, 2=bractea opening, 3=falling of bractea, 4A=no male bud left, 4B=male bud left at the end*)

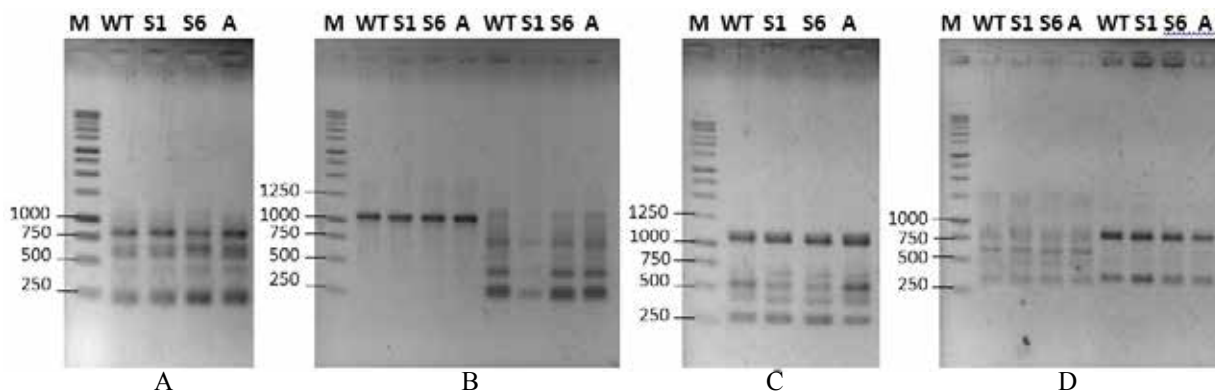
polimorfisme tunggal yang konsisten berbeda antara klon normal dan abnormal pada tanaman kelapa sawit.

Primer spesifik gen *PI* dan *AG* yang didesain berdasarkan informasi sekuen gen dari *M. acuminata*, kemudian diuji ke semua sampel tanaman, yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita tunggal pada ukuran antara 500–750 pb (Gambar 5). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semua sampel tanaman pisang yang tidak berbunga jantan maupun yang kembali berbunga jantan memiliki gen *Pistillata* dan *Agamous*. Pita DNA hasil amplifikasi tidak dapat memastikan bahwa semua sampel tanaman memiliki sekuen DNA yang sama, karena perbedaan satu basa seperti *single nucleotide polymorphism* (SNP) tidak dapat terdeteksi melalui elektroforesis agarose. Diduga terjadi variasi nukleotida pada tanaman yang diuji, sehingga dilakukan sekuensing guna melihat perbedaan basa antarsampel tanaman.

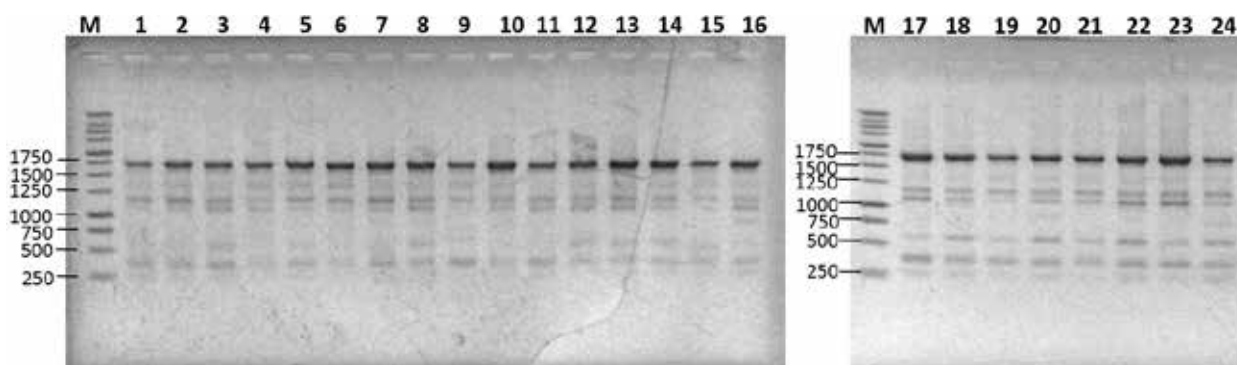
Hasil sekuensing dengan primer dari gen *PI* lebih baik dibanding hasil sekuensing dengan primer dari gen *AG*. Sekuensing dengan primer *AG* menghasilkan kromatogram dengan banyak *noise* yang mungkin disebabkan karena *multi template* sekuen *AG*, sehingga dapat mengganggu penentuan posisi basa DNA. Oleh karena itu, hanya hasil sekuensing fragmen PCR dengan primer dari gen *PI* yang digunakan untuk analisis tahap selanjutnya. Analisis BLAST pada NCBI menunjukkan bahwa sekuen nukleotida dari fragmen gen *Pistillata* tanaman pisang tidak berbunga jantan mempunyai kesamaan dengan sekuen nukleotida dari fragmen gen *Pistillata* asal *M. acuminata* (Tabel 5).

Hasil homologi menunjukkan nilai *query coverage* sebesar 31%, sedangkan hasil *alignment* sekuen DNA dengan program MEGA 5.0 diperoleh adanya variasi nukleotida dari fragmen dengan ukuran 532 pb. Terdapat tiga nukleotida yang berbeda (SNP) pada tanaman yang kembali berbunga jantan yaitu berada pada posisi nukleotida ke-445, 461, dan 507 (Gambar 6). Perbedaan nukleotida antara tanaman tidak berbunga jantan dan tanaman yang kembali berbunga jantan tidak menyebabkan perubahan pada asam amino, karena perbedaan nukleotida terjadi pada daerah 3' UTR (*non-coding region*). Diduga terdapat gen lain yang mengontrol karakter *male budless*.

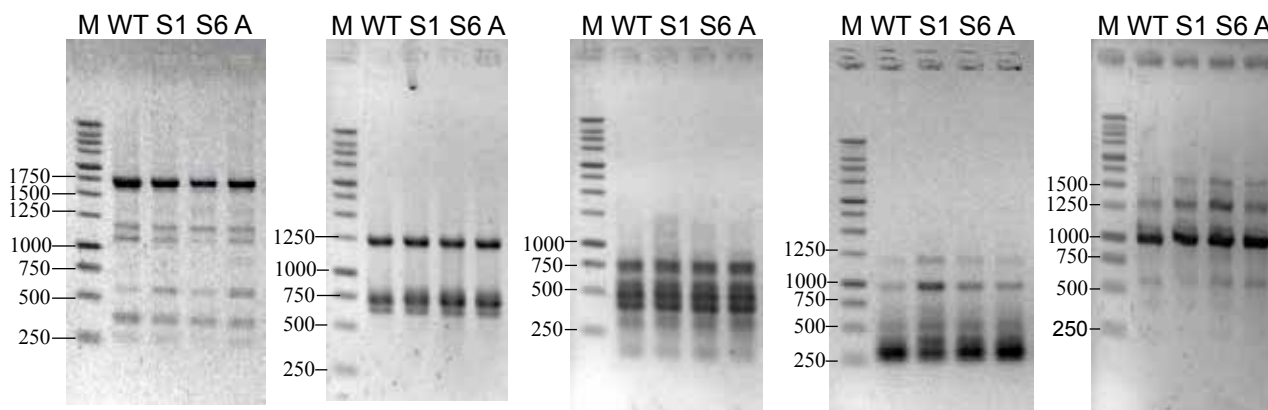
Perbedaan ekspresi gen *Pistillata* pada tanaman tidak berbunga jantan dan tanaman yang kembali berbunga jantan diduga terjadi akibat adanya variasi epigenetik. Peristiwa molekuler seperti metilasi DNA dan modifikasi histon dapat menyebabkan tidak tercetaknya informasi pada genom (*genomic imprinting*) (Holliday 2005). Terjadinya epigenetik digunakan untuk menyatakan adanya pengaruh pada aktivitas gen yang diwariskan, dimana pengaruh tersebut tidak melibatkan perubahan pada sekuen DNA. Terjadinya proses epigenetik merupakan konsekuensi adanya interaksi antara gen dan lingkungannya dan dapat terjadi akibat tidak terekspresinya suatu gen (*silenced genes*). Pada *male budless mutant* diduga terjadi hipermetilasi, yaitu terikatnya metil pada basa sitosin dan apabila terjadi pada daerah promotor maka gen tersebut tidak terekspresi, sedangkan pada *revertrant mutant* diduga terjadi hipometilasi, yaitu



Gambar 2. Pola pita DNA hasil amplifikasi dengan primer RAPD. A=OPA 2, B=OPA 12 dan OPA 13, C=OPA 16, D=OPJ 9 dan OPJ 16. M=marker (1 Kb DNA ladder, Promega), WT=tipe liar, S1=subkultur 1 tidak berbunga jantan, S6=subkultur 6 berbunga jantan, A=anakan mutan berbunga jantan (DNA banding pattern resulted from amplification using primer RAPD. A=OPA 2, B=OPA 12 and OPA 13, C=OPA 16, D=OPJ 9 and OPJ 16. M=marker (1 Kb DNA ladder, Promega), WT=wild type, S1=subculture 1 male budless, S6=subculture 6 revertrant mutant, A= suckers revertrant mutant)



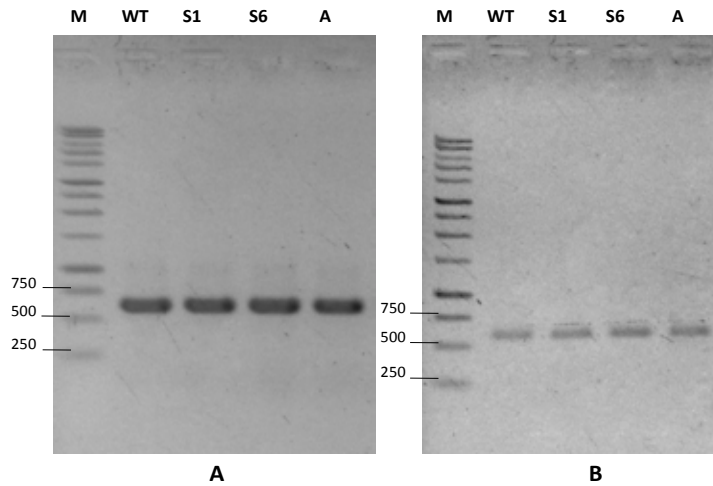
Gambar 3. Pola pita ISSR dengan primer PKBT-2 pada 24 tanaman pisang hasil subkultur 1-6. M=marker (1 kb DNA ladder, Promega), 1-3=subkultur 1, 4-5=subkultur 2, 6-8=subkultur 3, 9-15=subkultur 4, 16-21=subkultur 5, 22-23=subkultur 6, 24=Kepok Kuning (ISSR banding pattern by PKBT-2 primer on 24 banana plants from subculture 1-6. M=marker (1 kb DNA ladder, Promega), 1-3=subculture 1, 4-5=subculture 2, 6-8=subculture 3, 9-15=subculture 4, 16-21=subculture 5, 22-23=subculture 6, 24=kepok Kuning)



Gambar 4. Pola pita DNA hasil amplifikasi dengan primer ISSR. A=PKBT 2, B=PKBT 11, C=PKBT 9, D=PKBT 8, E=PKBT 6. M=marker (1 Kb DNA ladder, Promega), WT=tipe liar, S1=subkultur 1 tidak berbunga jantan, S6=subkultur 6 berbunga jantan, A=anakan mutan berbunga jantan (DNA banding pattern resulted from amplification with primer ISSR. A=PKBT 2, B=PKBT 11, C=PKBT 9, D=PKBT8, E=PKBT 6. M=Marker (1 Kb DNA ladder, Promega), WT=wild type, S1=subculture 1 male budless, S6=subculture 6 revertrant mutant, A= suckers revertrant mutant)

Tabel 5. Homologi antara sekuen fragmen DNA gen *Pistillata* tanaman pisang tidak berbunga jantan dengan aksesori-aksesori yang telah dideposit pada pangkalan data dari bank gen NCBI (*Homology comparison between partial fragment of DNA *Pistillata* gene derived from male budless banana plant and the accessions of *Pistillata* gene that deposited at the genebank database NCBI*)

Akresi bank gen (Gene bank accessions)	Deskripsi aksesori (Accession description)	Nilai maksimum (Maximum score)	Nilai total (Total score)	Query coverage (%)	Max ident (%)
EU869311.1	<i>Musa acuminata</i> AAA Group MADS-box protein MADS6 mRNA, complete cds	118	317	31	100
DQ005604.1	<i>M. ornata Pistillata</i> -like protein (Pla) mRNA, partial cds	118	317	31	100
AY941798.1	<i>M. acuminata</i> putative MADS box protein (MADS1) mRNA, partial cds	118	317	31	100
DQ005603.1	<i>M. ornata Pistillata</i> -like protein (Plb) mRNA, partial cds	104	263	31	94
EU433562.1	<i>Musa basjoo</i> Pistillata-like protein (PI-1) mRNA, partial cds	104	254	31	94



Gambar 5. Elektroforesis produk PCR. A=primer gen PI, B=primer gen AG. M=marker (1 Kb DNA ladder, Promega), WT=tipe liar, S1=subkultur 1 tidak berbunga jantan, S6=subkultur 6 berbunga jantan, A=anakan mutan berbunga jantan (*Electrophoresis PCR products. A= PI gene primer, B= AG gene primer. M=marker (1 Kb DNA ladder, Promega), WT=wild type, S1=subculture 1 male budless, S6=subculture revertrant mutant, A=suckers revertrant mutan*)

```

Wild      CGACAACATG CAGATCGAGT TGAGGTATGT TGTGCCATCT CATAGTTTCT [450]
Budless   ..... [450]
Bud       .....T..... [450]

Wild      CTCAACAGAA GAATTTGGTG GTCTTTTAT TTTGGCTTTT GTTTGTGGAT [500]
Budless   ..... [500]
Bud       .....T..... [500]

Wild      GATTAGGCAT CTGAAGGGGG AGGATCTCAA CT [532]
Budless   ..... [532]
Bud       .....T..... [532]
    
```

Gambar 6. Bagian dari Alignment nukleotida gen *Pistillata*. simbol (.)=basa DNA yang sama, simbol ()=basa DNA yang berbeda (*Part of nucleotide alignment on *Pistillata* gene, simbol (.)= same nucleotide, ()= different nucleotide*)

terlepasnya metil dari basa sitosin dan apabila terjadi pada daerah promotor maka gen-gen dapat terekspresi kembali (Fraga & Esteller 2002).

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Identifikasi morfologi menunjukkan adanya *revertant mutant*, yaitu dari perbanyakan subkultur ke-6 dan anakan namun tidak menyebabkan perubahan morfologi lain, kecuali ada atau tidaknya *male bud*.
2. Sebanyak 20 primer RAPD menghasilkan sebanyak 101 pita DNA dan 12 primer ISSR menghasilkan sebanyak 52 pita DNA. Pita yang dihasilkan ialah pita DNA monomorfik, sehingga belum dapat dijadikan sebagai alat untuk membedakan antara tanaman tipe liar dan tanaman mutan.
3. Amplifikasi dengan primer dari gen *PI* dan *AG* tidak menghasilkan pita DNA yang berbeda pada *male budless mutant* dan *revertant mutant*. Semua tanaman memiliki gen homeotik *Pistillata* (*PI*) dan *Agamous* (*AG*). Akan tetapi, ditemukan adanya tiga variasi nukleotida (SNP) pada gen *PI* yaitu pada daerah 3'UTR posisi nukleotida ke-445, 461 dan 507.

PUSTAKA

1. Adam, H, Jouannic, S, Orioux, Y, Morcillo, F, Richaud, F, Duval, Y & Tregear, JW 2007, 'Functional characterization of mads box genes involved in the determination of oil palm flower structure', *J. Exp. Bot.*, vol. 6, no. 58, pp. 1245-59.
2. Andebrhan, T & Furtek, DB 1994, 'Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of crinipellis perniciososa isolates from different host', *Plant Pathol.*, no. 43, pp. 1020-7.
3. Cote, FX, Sandoval, JA, Marie, PH & Auboiron, E 1993, 'Variation in micropropagated bananas and plantains: literature survey', *Fruit*, vol. 48, pp. 15-22.
4. Couch, JA & Fritz, PJ 1990, 'Isolation of DNA from plants high in polyphenolics', *Plant Mol. Biol.*, no. 8, pp. 8-12.
5. Doyle, JJ & Doyle, JL 1987, 'A rapid DNA isolation procedure for small quantities of tress leaf tissue', *Phytochem. Bull.*, no. 19, pp. 11-5.
6. Fraga, MF & Esteller, M 2002, 'DNA methylation: A profile of method and applications', *BioTechniques*, vol. 3, no. 33, pp. 632-49.
7. Hadiwiyono 2011, 'Blood bacterial wilt disease of banana: the distribution of pathogen in infected plant, symptoms, and potentiality of diseased tissues as source of infective inoculums', *Biosci.*, vol. 3, no. 3, pp. 112-7.
8. Holliday, R 2005, 'DNA methylation and epigenotypes', *Biochem.*, vol. 70, no. 5, pp. 500-4.
9. International Plant Genetic Resources Institute 1996, *Descriptor for Banana (Musa spp.)*, Montpellier, IPGRI-INIBAB/CIRAD.
10. Kaepler, SM, Kaepler, HF & Rhee, Y 2000, 'Epigenetic aspects of somaclonal variation plants', *Plant Mol. Biol.*, no. 43, pp. 178-88.
11. Karp, A 1995, 'On the current somaclonal variation as a tool for crop improvement', *Euphtica*, no. 85, pp. 295-302.
12. Kumar, A, Arya, L, Kumar, V & Sharma, S 2006, 'Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of cytoplasmic male sterile, male fertile lines and hybrids of pearl millet [*Pennisetu glaucum* (L.) R.Br.]', *Indian J. Crop Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 117-9.
13. Kurokawa, S, Shimizu, N, Uozomi, S & Yoshimura, Y 2003, 'ISSR variation in a worldwide collection of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and the genetic background of weedy strains mingled in grains imported into Japan', *Weed Biol. Manage.*, vol. 3, no. 3, pp. 179-83.
14. Lakshmanan, V, Reddampalli, SV & Neelwarne, B 2007, 'Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers', *Electronic J. of Biotechol.*, vol. 10, no. 5, pp. 1-8.
15. Mathius, TN & Hutabarat, T 1997, 'Analysis of genetic integrity of banana planlets from *in vitro* culture by random amplified polymorphic DNA (RAPD)', *Menara Perkebunan*, vol. 2, no. 69, pp. 17-25.
16. Mathius, TN, Bangun, SII & Bintang, M 2001, 'Analisis abnormalitas tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) hasil kultur jaringan dengan teknik random amplified polymorphism DNA (RAPD)', *Menara Perkebunan*, vol. 2, no. 69, pp. 58-70.
17. Mathius, TN, Yuniastuti, N, Setiamiharja, R & Karmana, MH, 2005, 'Analisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) dengan amplified fragment length polymorphism (AFLP)', *Menara Perkebunan*, vol. 1, no. 73, pp. 12-25.
18. Rustam 2005, 'Pengendalian penyakit darah pada tanaman pisang dengan bakteri antagonis', Tesis, Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
19. Skirvin, RM, Norton, M & McPheters, KD 1993, 'Somaclonal variation: has it proved useful for plant improvement', *Acta Hort.*, no. 336, pp. 333-40.
20. Skirvin, RM, McPheters, KD & Norton, M 1994, 'Sources and frequency of somaclonal variation', *Hort.Sci.*, vol. 29, no. 11, pp. 1232-7.
21. Sobir, Suhartanto, MR, Harti, H & Nasution, MA 2008, *Pengembangan pisang sebagai penopang ketahanan pangan nasional*, Pusat Kajian Buah Tropika LPPM IPB, Bogor.
22. Tamura, K, Peterson, D, Peterson, N, Stecher, G, Nei, M, & Kumar, S 2001, 'MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods', *Mol. Biol. Evol.*, vol. 28, no. 10, pp. 2731-9.
23. Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F & Higgins, DG 1997, 'The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools', *Nucl. Acid. Res.*, vol. 25, no. 24, pp. 4876-2739.
24. Tregear, JW, Morcillo, F, Richard, F, Berger, A, Singh, R, Cheah, SC, Hartmann, C, Rival, A & Duval, Y 2002, 'Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events', *J. Experimental Bot.*, vol. 53, no. 373, pp. 1387-96.