

Analisis Jarak Genetik dan Keekerabatan Aksesori-aksesori Pisang berdasarkan Primer *Random Amplified Polymorphic DNA*

Sukartini

Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Jl. Raya Solok-Aripan Km. 8, Solok 27301
Naskah diterima tanggal 2 Juli 2007 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 8 Maret 2008

ABSTRAK. Penelitian dilakukan di Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor pada bulan Oktober 2000. Tujuan penelitian adalah mengetahui jarak genetik dan keekerabatan 26 aksesori pisang berdasarkan primer RAPD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa koefisien kemiripan genetik antara 26 aksesori pisang berkisar antara 0,452-0,976 atau jarak genetik 0,548-0,024. Genom A dan B berbeda klaster pada koefisien kemiripan genetik 0,80 atau jarak genetik 0,20, kecuali pada aksesori Ampyang (AAA), Nangka (AAB), Cici Kuning (AA), dan Sililit (AAB). Zuriat-zuriat dengan keragaman karakter yang tinggi diperoleh dari persilangan antaraksesori Cici Kuning (AA) dengan Klutuk (BB) atau Cici Kuning dengan Klutuk Wulung (BB). Primer RAPD dapat digunakan untuk tujuan meningkatkan efisiensi, efektivitas, dan ketepatan identifikasi varietas pada program pemuliaan pisang.

Katakunci: *Musa* spp.; RAPD; Jarak genetik; Keekerabatan

ABSTRACT. Sukartini. 2008. Analysis of Genetic Distance and Relationship of Banana Based on RAPD Primers. The research was conducted at Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops, Bogor, in October 2000. The research objective was to determine the genetic distance and relationship among 26 banana accessions based on RAPD. The results showed that the genetic distance was between 0.548-0.024. A and B genome were different cluster with genetic similarity coefficient of 0.80 or genetic distance 0.20. Zuriates with high characters variability could be found from crossing of Cici Kuning (AA) with Klutuk (BB) or Cici Kuning with Klutuk Wulung (BB). RAPD primers could be used to increase efficiency and effectivity as well as precise variety identification in banana breeding.

Keywords: *Musa* spp.; RAPD; Genetic distance; Relationship

Keragaman genetik yang tinggi pada pisang, khususnya untuk kelompok *Eumusa*, disebabkan oleh seleksi partenokarpi, seleksi sterilitas, sterilitas total, seleksi hasil hibridisasi, dan poliploidisasi. Hal ini menyebabkan tersebarnya genom A dari jenis *M. acuminata* liar (AA) maupun genom B dari jenis *M. balbisiana* liar (BB) menjadi pisang-pisang bergenom AAAA, AAA, ABBB, ABB, AAB, dan AB (Simmonds 1962).

Karakterisasi merupakan kegiatan penting dalam pengelolaan plasma nutfah yang digunakan untuk menyusun deskripsi suatu varietas dalam rangka seleksi tetua pada program pemuliaan. Pada tanaman pisang, kegiatan karakterisasi tidak hanya mengidentifikasi jenis atau varietas pisang, tetapi juga menentukan hubungan genetik atau keekerabatan di antara aksesori pisang tersebut. Pada mulanya penaksiran keanekaragaman plasma nutfah tanaman menggunakan penanda karakter morfologi, kemudian berkembang dengan penggunaan penanda biokimia, seperti isozim (Scandalios 1969) dan teknik-teknik biologi

molekuler yang berbasis DNA. Keuntungan teknik molekuler adalah tidak terpengaruhnya susunan DNA oleh perbedaan faktor lingkungan asal tanaman sampel, sehingga memungkinkan penggunaan tanaman sampel dari berbagai lokasi. Penggunaan teknik-teknik yang berbasis DNA, seperti RFLP, RAPD, AFLP, dan SSR telah banyak digunakan untuk mendeteksi ragam genetik atau identifikasi intra maupun interpopulasi (Bernatzsky dan Tankley 1986, Bustaman dan Moeljopawiro 1998, Jonathan *et al.* 1998, Ortiz dan Vuylsteke 1995, Toruan-Mathius dan Hutabarat 1997, Jarret *et al.* 1993, Baurens *et al.* 2003, Bhat *et al.* 2004, Buhariwalla *et al.* 2005, Carreel *et al.* 2002, Creste *et al.* 2003, Ge *et al.* 2005, Nguyen *et al.* 2002, Nwakanma *et al.* 2003a, Nwakanma *et al.* 2003b, Onguso *et al.* 2004, Pillay *et al.* 2004).

Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika dan Kebun Raya Purwodadi memiliki koleksi plasma nutfah pisang yang perlu dibedakan identitas genetiknya, agar secara efektif dapat digunakan

sebagai materi pemuliaan. Hubungan kekerabatan genetik antargenotip dalam populasi dapat diukur berdasarkan kesamaan sejumlah karakter, sehingga dapat diasumsikan bahwa karakter yang berbeda dari suatu individu, menggambarkan perbedaan susunan genetiknya. Dengan demikian perbedaan genom pada tanaman pisang dapat dideteksi oleh primer-primer tertentu yang digunakan sebagai penanda identitas genetik masing-masing aksesi tanaman pisang.

Tujuan penelitian adalah mengetahui nilai koefisien kemiripan genetik atau nilai koefisien jarak genetik dan kekerabatan pada plasma nutfah pisang Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika dan Kebun Raya Purwodadi. Data keragaman diperlukan untuk perakitan varietas pada program pemuliaan tanaman pisang.

BAHAN DAN METODE

Analisis RAPD dilakukan di Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Bogor pada bulan Oktober 2000. Bahan penelitian yang digunakan adalah 24 aksesi pisang koleksi Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan (Cici Kuning, Lampung, Monyet, Mas, Sasi, Klutuk, Klutuk Wulung, Ambon Kuning, Ambon Hijau, Badak, Ambon Hong, Barangan, Ampyang, Nangka, Byar, Candi, Raja Lumut, Seribu, Raja Pulut, Raja Sere, Kepok Kuning, Kepok Putih, Ebung, Kepok Gabu) dan 2 aksesi pisang koleksi Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika (Sililit dan Awak). Isolasi DNA dilakukan menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994). Daun tanaman pisang yang masih menggulung seberat 0,3 g diletakkan dalam mortar, kemudian ditambahkan nitrogen cair dan digerus dengan pestel. Serbuk daun yang didapat, dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi 1 ml buffer ekstraksi (10% CTAB, 0,5 M EDTA pH 8, 1 M Tris HCl pH 8, 5 M NaCl, akuades steril, dan 1% β -mercaptoethanol bersuhu 60°C) kemudian campuran dihomogenkan dengan vorteks, selanjutnya diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 30 menit dengan sesekali dikocok. Pemurnian DNA dilakukan dengan penambahan 0,7 ml buffer purifikasi (kloroform: isoamil alkohol=24:1 v/v), dan pemisahan fraksi di dalam campuran dilakukan dengan sentrifugasi 10.000 rpm, selama 10 menit. Fase cair yang diperoleh kemudian dipindahkan ke dalam

microtube steril baru dan dimurnikan lagi dengan menambahkan 1 ml buffer purifikasi yang sama seperti langkah sebelumnya, sampai didapatkan emulsi DNA. Pengendapan DNA dilakukan dengan memindahkan emulsi ke dalam *microtube* steril baru, kemudian ditambahkan 0,5 ml buffer pengendap DNA (1/10 volume ammonium asetat 3 M pH 5,2 dan 2x volume etanol absolut dingin), kemudian disentrifugasi pada 25.000 rpm selama 15 menit. Fase cair dibuang dan fase padat dikeringkan dengan cara membalikkan tabung di atas kertas tisu, kemudian dibilas dengan etanol 70% dan dikeringkan kembali. Fase padat selanjutnya dilarutkan dalam 200 μ l TE (1 M Tris HCl pH 8, 0,5 M EDTA pH 8, dan akuades). Kuantitas DNA stok diketahui melalui pemisahan pada perangkat elektroforesis bersama-sama dengan DNA standar, yaitu DNA λ 500 ng, pada 1% gel agarose yang mengandung 1,5 μ l etidium bromida 1%. Chamber elektroforesis yang digunakan berisi 1x buffer TAE (Tris base, asam asetat glasial, 0,5 M EDTA pH 8, akuades) yang mengandung 13 μ l etidium bromida 1%. DNA target dibuat dengan konsentrasi 25 ng/ μ l dengan penambahan akuades. Amplifikasi DNA dilakukan menurut metode William *et al.* (1990) menggunakan primer OPC 6 (GAACGGACTC), OPC 9 (CTCACCGTCC), OPC 15 (GACGGATCAG), OPC 16 (CACACTCCAG), OPD 3 (GTCGCCGTCA), OPD 5 (TGAGCGGACA), OPD 13 (GGGGTGACGA), OPH 12 (ACGCGCATGT), OPH 14 (ACCAGTTGG), dan OPH 19 (CTGACCAGCC). 25 μ l campuran larutan yang digunakan terdiri dari 2,5 μ l 10x buffer reaksi (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,25°C, 1% Triton X-100), 2 μ l DNA sampel 25 ng/ μ l, 14,3 μ l H₂O, 2,5 μ l dNTPs 2 mM, 1 μ l primer 10 pmol, 0,2 μ l Tag DNA polimerase, 2,5 μ l MgCl₂ 25 mM, dan minyak mineral sebanyak 20 μ l. Siklus amplifikasi sebanyak 45x yang terdiri dari tahap pemisahan (94°C, 1 menit), tahap pengentalan (36°C, 1 menit), tahap pemanjangan (72°C, 2 menit), dengan tahap pemisahan awal (94°C, 1 menit), dan tahap pemanjangan akhir (72°C, 4 menit). Hasil amplifikasi selanjutnya ditambah 5 μ l 6x loading buffer (0,25% bromofenol blue dan 40% (w/v) sukrose). Elektroforesis dilakukan dengan memipet 15 μ l DNA pada 1,4% gel agarose (b/v), yang mengandung 1,5 μ l 1% etidium bromida dengan DNA standar 2,5 μ l/ μ l

1 KB Ladder sebanyak 12 µl. Chamber berisi larutan buffer 1x buffer TAE yang mengandung 13 µl etidium bromida 1%, pada voltase konstan 50 volt selama 1 jam.

Teknik pembacaan pita DNA pada laju migrasi tertentu diurutkan dengan bantuan DNA standar (1 KB Ladder). Profil pola pita DNA hasil amplifikasi diterjemahkan menjadi data biner (1=ada pita DNA, 0=tidak ada pita DNA). Analisis data untuk mengetahui kemiripan genetik dan hubungan kekerabatan menggunakan analisis kluster, dengan teknik berhierarki. Penghitungan derajat kemiripan genetik dan nilai jarak genetik antaraksesi pisang menggunakan program NTSYS versi 2.1. Ukuran derajat kedekatan genetik antaraksesi berdasarkan koefisien kemiripan genetik atau koefisien jarak genetik. Mula-mula koefisien kemiripan genetik Dice dihitung dengan rumus:

$$S_b = \frac{2a}{(n_i + n_j)}$$

S_b = koefisien kemiripan genetik Dice, a = total pita (nilai 1) yang dimiliki oleh aksesori ke- i dan ke- j , n_i dan n_j = total nilai 1 dari kolom ke- i dan ke- j , d = jarak (Fuentes *et al.* 1999). Kemudian jarak genetik antaraksesi pisang = d dihitung dengan rumus:

$$d = 1 - S_b$$

Analisis kekerabatan diperoleh dengan melakukan analisis kluster melalui teknik hirarki (Beer *et al.* 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

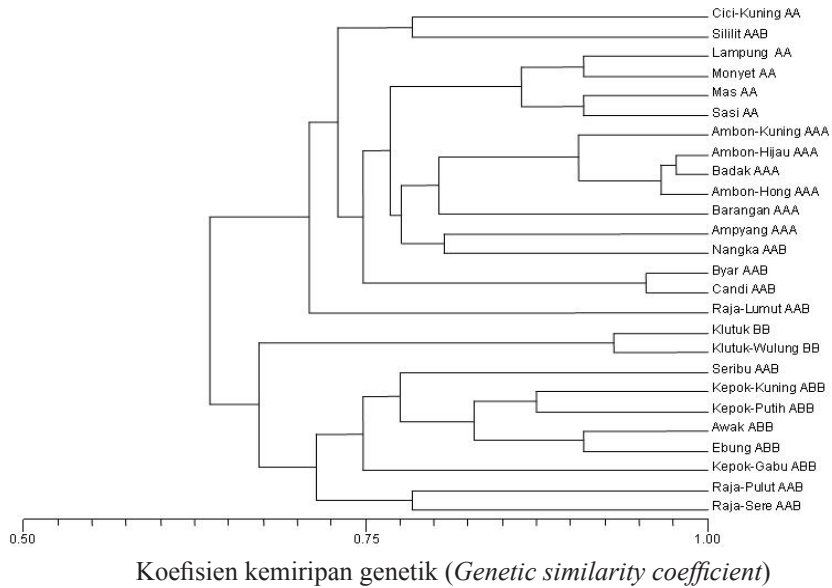
Hasil amplifikasi RAPD menggunakan 10 primer pada 26 aksesori pisang menghasilkan fragmen antara 250-2.000 pasang basa dengan total polimorfisme sebanyak 83 polimorfis.

Koefisien kemiripan genetik antaraksesi pisang berkisar antara 0,452-0,976 atau jarak genetik antara 0,548-0,024 (Tabel 1). Koefisien kemiripan genetik 0,452 atau jarak genetik 0,548 dijumpai antara aksesori Cici Kuning (AA) dengan Klutuk (BB) dan aksesori Cici Kuning (AA) dengan Klutuk Wulung (BB), sedangkan koefisien kemiripan genetik 0,976 atau jarak genetik 0,024

dijumpai antara aksesori Ambon Hijau (AAA) dengan Badak (AAA) dan aksesori Badak dengan Ambon Hong (AAA).

Hasil analisis kluster melalui teknik hirarki terhadap polimorfisme fragmen DNA menghasilkan gambaran kedudukan dan sekaligus kekerabatan antaraksesi pisang dalam dendrogram (Gambar 1). Pada koefisien kemiripan 0,70 atau jarak genetik 0,30 aksesori-aksesi pisang bergenom AA (Cici Kuning, Lampung, Monyet, Mas, dan Sasi) dan AAA (Ambon Kuning, Ambon Hijau, Badak, Ambon Hong, Barangan, dan Ampyang) berada dalam 1 kelompok dengan beberapa aksesori pisang bergenom AAB (Sililit, Nangka, Byar, dan Candi). Pada koefisien kemiripan 0,75 atau jarak genetik 0,25, aksesori-aksesi pisang bergenom ABB berada dalam 1 kelompok kecuali pisang Seribu yang bergenom AAB. Pada koefisien kemiripan 0,80 atau jarak genetik 0,20 genom A berbeda kluster dengan genom B kecuali pada aksesori Ampyang (AAA) dan Nangka (AAB) maupun Cici Kuning (AA) dan Sililit (AAB). Dari dendrogram diketahui pula bahwa kedudukan aksesori-aksesi pisang yang bergenom AAB (Raja Sere, Raja Pulut, Seribu, Raja Lumut, Candi, Byar, Nangka, dan Sililit) tidak berada dalam 1 kelompok. Tidak mengelompoknya aksesori-aksesi pisang yang bergenom sama membuktikan adanya perbedaan asal genom pada aksesori-aksesi pisang tersebut. Selain itu sedikitnya jumlah polimorfisme yang diperoleh dari hasil amplifikasi (83 polimorfis) juga mempengaruhi keakuratan pengelompokan.

Faktor yang menentukan keberhasilan persilangan antaraksesi pisang selain faktor kemudahan melakukan persilangan dan tingkat sterilitas juga besarnya nilai koefisien kemiripan genetik atau jarak genetik antaraksesi pisang tersebut. Semakin kecil nilai koefisien kemiripan genetik (mendekati 0) atau semakin besar jarak genetik (mendekati 1) antara 2 aksesori yang akan disilangkan, maka tingkat keberhasilan persilangan akan semakin kecil, demikian pula sebaliknya. Berdasarkan uraian di atas maka pada pemuliaan tanaman pisang, zuriat-zuriat dengan keragaman karakter tinggi dapat diperoleh dari persilangan antaraksesi yang mempunyai koefisien kemiripan genetik kecil atau berjarak genetik besar seperti persilangan antara pisang Cici Kuning (AA) dengan Klutuk (BB) atau



Gambar 1. Dendrogram aksesi-aksesi pisang (*Dendrogram of musa accessions*)

dengan Klutuk Wulung (BB). Sebaliknya persilangan antara pisang Ambon Hijau (AAA) dengan Badak (AAA) atau Ambon Hong (AAA) dengan Badak (AAA) akan menghasilkan turunan dengan keragaman karakter rendah.

KESIMPULAN

1. Koefisien kemiripan genetik antar 26 aksesi pisang berkisar antara 0,452-0,976 atau pada jarak genetik 0,548-0,024.
2. Pada koefisien kemiripan 0,80 atau jarak genetik 0,20 genom A berbeda klaster dengan genom B kecuali pada aksesi Ampyang (AAA) dan Nangka (AAB) maupun Cici Kuning (AA) dan Sililit (AAB).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Sudarmadi Purnomo, PU yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian ini dan Dr. Nurita Toruan Mathius, PU yang telah membimbing dan banyak memberi saran selama pelaksanaan penelitian di laboratorium.

PUSTAKA

1. Baurens, F.C., F. Bonnot, D. Bienvenu, S. Causse, T. Legavre. 2003. Using SD-AFLP and MSAP to Assess CCGG Methylation in the Banana Genome. *Plant Mol. Biol. Reporter* 21(4):339-348.
2. Beer, S.C., J. Goffreda, T.D. Phillips, and M.E. Sorrells. 1993. Assesment of Genetic Variation in Avena Sterilis Using Morphological Traits, Isozymes, and RFLPs. *Crop Sci.* 33:1386-1393.
3. Bernatzsky, R. and S.D. Tanksley. 1986. Towards a Saturated Linkage Map in Tomato Based on Isozymes and Random cDNA Sequences. *Genet.* 112:887-898.
4. Bhat K.V., Y. Amaravathi, P.L. Gautam, and 261K.C. Velayudhan. 2004. AFLP Characterization and Genetic Diversity Analysis of Indian Banana and Plantain Cultivars (*Musa spp.*). *Plant Genet. Resources* 2(2):121-130.
5. Buhariwalla H.K., R. Jarret, B. Jayashree, J.H. Crouch, and R. Ortiz. 2005. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers from *Musa balbisiana*. *Mol. Ecol. Notes* 5:327-330.
6. Bustaman, M. dan Moeljopawiro. 1998. Pemanfaatan Teknologi Sidikjari DNA di Bidang Pertanian. *J. Pemuliaan Indonesia.* 9(2):77-90.
7. Carreel F., D. Gonzales de Leo, P. Lagoda, C. Lanaud, C. Jenny, J.P. Horry, and H. Tézenas du Montcel. 2002. Ascertaining Maternal and Paternal Lineage within *Musa* by Chloroplast and Mitochondrial DNA RFLP Analysis. *Genome* 45:679-692.

8. Creste S., A. Tulmann Neto, S.O. Silva, and A. Figueira. 2003. Genetic Characterization of Banana Cultivars (*Musa* spp.) from Brazil Using Microsatellite Markers. *Euphytica* 132(3):259-268.
9. Fuentes, J.L., F. Escobar, A. Alvares, G. Gallego, M.C. Dugue, M. Ferrer, J. Enrique, and J.M. Tohme. 1999. Analysis of Genetic Diversity in Cuban Rice Varieties Using Isozyme, RAPD, and AFLP Markers. *Euphytica*. 109:107-115.
10. Ge X.J., M.H. Liu, W.K. Wang, B.A. Schaal, and T.Y. Chiang. 2005. Population Structure of Wild Bananas, *Musa balbisiana*, in China Determined by SSR Fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP. *Mol. Ecol.* 14:933-944.
11. Jarret, R.L., D.R. Vuylsteke, N.J. Gawel, R.B. Pimentel, and L.J. Dunbar. 1993. Detection Genetic Diversity in Diploid Bananas Using PCR and Primers from a Highly Repetitive DNA Sequence. *Euphytica* 68:69-76.
12. Jonathan, H.C., D. Vuylsteke, and R. Ortiz. 1998. Perspectives on the Application of Biotechnology to Assist the Genetic Enhancement of Plantain and Banana (*Musa* spp.). *Electronic J. Biotechnol.* 1(1):1-3. April 1998.
13. Nguyen X.T., T.L.O. Le, and H.N. Ho. 2002. Using RAPD Technique for Identifying and Classifying Some Banana Cultivars in Vietnam. *Infomusa* 11(1):48-49.
14. Nwakanma D.C., M. Pillay, B.E. Okoli, and A. Tenkouano. 2003a. PCR-RFLP of the Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers (ITS) Provides Markers for the A and B Genomes in *Musa* L. *Theor. Appl. Genet.* 108(1):154-159.
15. _____ . 2003b. Sectional Relationships in the Genus *Musa* L. Inferred from the PCR-RFLP of Organelle DNA Sequences. *Theor Appl.Genet.* 107: 850-856.
16. Scandalios, J.G. 1969. Genetic Control of Multiple Forms of Enzymes in Plants: A review. *Biochem. Genet.* 3:37-79.
17. Simmonds, N. W. 1962. *The Evolution of the Bananas*. Longman. London. 170 p.
18. Toruan-Mathius, N. and T. Hutabarat. 1997. Analysis of Genetic Integrity of Banana Planlets from In-vitro Culture by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Menara Perkebunan.* 65(1):17-25.
19. Onguso J.M., E.M. Kahangi, D.W. Ndiritu, and F. Mizutani. 2004. Genetic Characterization of Cultivated Bananas and Plantains in Kenya by RAPD Markers. *Scientia Horticulturae.* 99(1):9-20.
20. Ortiz, R. and D.R. Vuylsteke. 1995. Inheritance of Dwarfism in Plantain (*Musa* spp., AAB group). *Plant Breeding.* 114:466-468.
21. Orozco-Castillo, K., J. Chalmera, R. Waugh, and W. Powell. 1994. Detection of Genetic Diversity and Selective Gene Introgression in Coffee Using RAPD Marker. *Theor. Appl. Genet.*, 87:934-938.
22. Pillay M., A. Tenkouano, G. Ude, and R. Ortiz, 2004. Molecular Characterization of Genomes in *Musa* and Its Applications. in *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations* in Jain, S.M. (Ed.), Swennen, R. (Ed.). *Proceedings from a Meeting. Leuven, Belgium, 2001/09/24-28*. Science Publishes, Enfield, USA. pp.271-286
23. Valmayor, R.V., S.H. Jamaluddin, B. Silayoi, S. Kusumo, L.D. Danh, O.C. Pascua, and R.R.C. Espino. 1999. Banana Names and Synonyms Workshop: Results and Recommendations. *RISBAP Bull.* 3(6):2-3.
24. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingy. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.