

## Genetic Diversity of Bananas (*Musa spp.*) in Pesawaran District, Lampung Province Based on Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) Marker

Leni Agustin<sup>1\*</sup>, Eti Ernawati<sup>1\*</sup>, Lulut Dwi Sulistyaningsih<sup>2\*</sup>, Mahfut<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Lampung, Indonesia;

<sup>2</sup>Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Indonesia;

### Article History

Received : August 07<sup>th</sup>, 2023

Revised : August 31<sup>th</sup>, 2023

Accepted : October 15<sup>th</sup>, 2023

\*Corresponding Author:

**Leni Agustin, Eti Ernawati, Lulut Dwi Sulistyaningsih,**  
Program Studi Biologi,  
Lampung, Indonesia.

Pusat Riset Biosistemika dan  
Evolusi, Badan Riset dan  
Inovasi Nasional, Indonesia;

Email:

[leniagustin714@gmail.com](mailto:leniagustin714@gmail.com)

[etiernawiat@fmipa.unila.ac.id](mailto:etiernawiat@fmipa.unila.ac.id)

[lulutjv@gmail.com](mailto:lulutjv@gmail.com)

**Abstract:** Banana (*Musa spp.*) is a leading commodity that makes a major contribution to national fruit production. One of the districts in Lampung Province which has a significant contribution to Indonesia's banana production is Pesawaran Regency. The molecular marker used in this study is Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP). This study aims to determine the genetic diversity of bananas, determine the suitable combination of SRAP primers to determine the genetic diversity of bananas and determine the similarity relationship of bananas in the Pesawaran District. The total genomic DNA was extracted using DNeasy Plant Mini Kit (Geneaid) according to the protocol from the manufacturer followed by their amplification using SRAP primers. Similarity analysis was carried out based on similarity index values and dendrogram construction using the NTSYS 2.0 program. Research results show that a total of 204 loci (167 polymorphic loci and 37 monomorphic loci) were obtained from 9 selected primer combinations. The genetic diversity of 19 banana cultivars originating from Pesawaran Regency resulted in low genetic diversity values (0-0.27). Banana kinship based on Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) markers divided 19 banana cultivar samples and 4 wild banana samples into 2 large clusters with similarity coefficient values between 0.70-0.97.

**Keywords:** Bananas, genetic diversity, Lampung, Pesawaran, SRAP.

### Pendahuluan

Pisang (*Musa spp.*) salah satu buah tropis yang paling populer di Indonesia. Pisang dapat dikonsumsi langsung sebagai buah atau dapat diolah menjadi makanan lain. Pisang yang dibudidayakan sebagian besar telah berevolusi dari 2 spesies pisang liar (*Musa balbisiana* Colla dan *Musa acuminata* Colla), masing-masing mendonor genom A dan B pada pisang budidaya (Simmonds 1962). Upaya pemuliaan saat ini untuk perbaikan pisang bergantung pada intrograsi gen-gen yang berguna dari progenitor diploid liar dan budidaya (Ortiz & Vuylsteke 1994). Oleh karena itu perlu dilakukan kajian keragaman genetik dan hubungan antara aksesori diploid liar dan budidaya. Provinsi Lampung

adalah sentra produksi pisang di Indonesia. Salah satu kabupaten di Provinsi Lampung dengan produktivitas pisang yang relatif tinggi adalah Kabupaten Pesawaran.

Menurut data Badan Pusat Statistika (2022), sepanjang tahun 2022 Indonesia mampu memproduksi pisang sebanyak 9,24 juta ton, meningkat dari tahun sebelumnya, yaitu sebesar 8,74 juta ton pada tahun 2021. Badan Pusat Statistika menginformasikan bahwa produksi pisang terus meningkat selama 5 tahun terakhir dengan peningkatan 5,2% per tahun. Provinsi Lampung menduduki posisi ketiga yang memberikan kontribusi sebesar 1,22 juta ton terhadap produksi pisang nasional tahun 2022. Kontribusi provinsi Jawa Timur sebesar 2,62 juta ton dan Jawa barat sebesar 1,31 juta ton

(BPS, 2022). Besarnya kontribusi Provinsi Lampung terhadap produksi pisang di Indonesia menunjukkan bahwa Provinsi Lampung adalah habitat yang sesuai untuk budidaya pisang. Mengacu pada data Badan Pusat Statistika (2021), Kabupaten Pesawaran merupakan kabupaten dengan sentra produksi pisang yang tinggi di Provinsi Lampung.

Keanekaragaman pisang dapat dianalisis melalui pendekatan morfologi dan molekuler. Aspek morfologi dan molekuler memiliki keterkaitan satu sama lain. Perbedaan morfologi tidak dapat mengkonfirmasi perubahan genetik, hal ini dikarenakan karakter morfologi dipengaruhi oleh faktor lingkungan, berbeda dengan penanda molekuler yang tidak dapat berubah karena pengaruh lingkungan. Identitas suatu tanaman dapat diidentifikasi menggunakan penanda molekuler sehingga hasilnya lebih akurat. Hubungan kesamaan dan adanya polimorfisme dalam suatu spesies dapat diketahui menggunakan penanda molekuler DNA yang menggambarkan keragaman karakter antar individu yang lebih tinggi. Penanda molekuler sering dimanfaatkan untuk mendeteksi keragaman genetik pisang dan identifikasi pisang budidaya. Ada beberapa penanda molekuler yang sering dilakukan untuk studi keragaman genetik dan hubungan kesamaan pisang seperti *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Inter-Simple Sequence Repeats* (ISSR), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), dan *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP).

SRAP adalah penanda molekuler yang pertama kali diperkenalkan oleh Li & Quiros pada tahun 2021. SRAP adalah penanda sederhana dan efisien yang dapat digunakan untuk berbagai keperluan seperti pemetaan berdasarkan kloning, penandaan gen, cDNA dan analisis sidik jari gen. Keunggulan yang dimiliki SRAP yaitu memiliki tingkat *throughput* yang wajar, menargetkan *open reading frames* (ORFs), sistem sederhana, mendekati beberapa marka molekuler kodominan, dan memudahkan isolasi untuk sekuensing. Dibandingkan dengan penanda molekuler lainnya, SRAP lebih dapat direproduksi dan relatif murah. Selain itu, SRAP telah efektif digunakan untuk menganalisis keragaman genetik karena sifat multilokus dan multialelnya. Adanya kajian keragaman genetik pisang berdasarkan SRAP di Kabupaten

Pesawaran akan menambah informasi tentang keragaman genetik kultivar pisang di Kabupaten Pesawaran. Data tersebut dapat dijadikan acuan dalam hal program konservasi dan pemuliaan tanaman pisang.

## Bahan dan Metode

### Alat dan bahan

Alat yang digunakan meliputi, box kedap udara (biokips), *tea bag*, silika gel, cetakan agarosa, microtube (*Axygen*), tip (*Axygen*), peralatan gelas (*Pyrex*), *waterbatch* (*Taitec Corporation*), *vortex* (*genie 2*), timbangan digital, pestle, plastik ziplock, *freezer*, *microwave* (*Bompani*), mortar, mikropipet (*Oxford*), apparatus elektroforesis (*Mupid eXu*), sentrifuge (*Benchmark*), Gel Documentation System (*ATTO*), mesin PCR (*Wealtec SEDI G*).

Penelitian menggunakan bahan meliputi sampel daun muda pisang, pasir kuarsa, kit isolasi DNA (*Geneaid*) terdiri atas GPX1 buffer, GP2 buffer, GP3 buffer, W1 buffer, Wash buffer, Elution buffer dan *RNAse*, *Safe DNA dye*, TBE (Tris boric acid-EDTA), *Green Master Mix* (*Promega*), DNA ladder 1 kb dan 100 bp (*Thermo Scientific*), *loading dye* (*Thermo Scientific*), primer *forward* (Me 1, Me 2, Me 3, Me 4, Me 5, Me 6, dan Me 7) primer *reverse* (Em 1, Em 2, Em 3, Em 4, Em 5, Em 7, DAN Em 8), ddH<sub>2</sub>O (NFW), dan *gel red*.

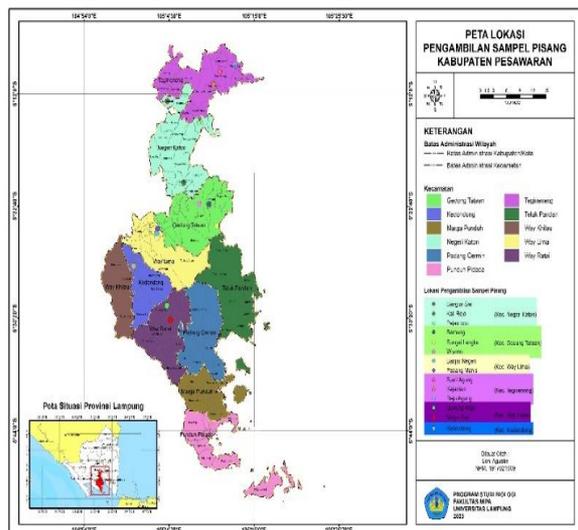
### Koleksi sampel

Sampel tanaman pisang pada penelitian ini diambil di Kabupaten Pesawaran yang meliputi 6 kecamatan, antara lain Kecamatan Negeri Katon, Gedung Tataan, Way Lima, Tegineneng, Way Ratai, dan Kedondong.

### Isolasi DNA

Kit isolasi DNA tanaman dari Genomic DNA Mini Kit Plant (*GeneAid*) digunakan untuk mengisolasi DNA. Menggerus sampel daun muda pisang menggunakan mortar dan pestle dengan bantuan pasir kuarsa hingga halus. Setelah halus, memasukkan sampel ke tabung 1,5 µl. GP1 *buffer* dan 5 µl *RNAse* ditambahkan sebanyak 400 µl lalu divorteks sampai homogen. Kemudian, menginkubasi sampel dalam *waterbath* selama 10 menit dengan suhu 60°C. Tabung harus dibolak balik setiap 5 menit sehingga sampel dan *buffer* tercampur sempurna,

dan terjadi proses lisis yang baik. Sebanyak 80  $\mu$ l/sampel *Elution buffer* yang telah dipanaskan akan digunakan di tahap akhir isolasi DNA.



**Gambar 1.** Peta Lokasi Pengambilan Sampel

Sampel yang sudah diinkubasi selama 10 menit, menambahkan 100  $\mu$ l GP2 *buffer* dan memvorteks selama 10 detik. Selanjutnya, menginkubasi selama 3 menit pada wadah berisi es dan disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 20°C selama 5 menit. Memindahkan hasil sentrifus ke dalam rangkaian *GD column dan filter column*, lalu disentrifus kembali pada kecepatan 3.500 rpm dengan suhu 20°C selama 1 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung 1,5 ml. Menambahkan GP3 *buffer* sebanyak 1,5 dari volume sampel dan memvorteks selama 5 detik. Sebanyak 700  $\mu$ l sampel yang telah divorteks dipindahkan ke dalam rangkaian *GD column dan filter column* dan disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit, supernatan dibuang lalu ditambahkan kembali sampel yang tersisa dan disentrifus kembali pada kecepatan dan waktu yang sama, supernatan dibuang.

Menambahkan 400  $\mu$ l W1 *buffer* kemudian, disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik, supernatan dibuang. Ditambahkan 600  $\mu$ l Wash *buffer*, lalu disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik, supernatan dibuang. Kemudian sampel disentrifus kembali selama 3 menit, supernatan dibuang. Dirangkai *filter column* dalam tabung 1,5  $\mu$ l. Ditambahkan 80  $\mu$ l *Elution buffer* yang telah hangat pada setiap sampel, diinkubasi

dalam suhu ruang selama 5 menit, lalu disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. DNA hasil isolasi kemudian disimpan di lemari es.

## Uji Kualifikasi DNA

### Pembuatan Gel Agarosa 1 %

Kualifikasi DNA dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agarosa 1 %. Sebanyak 0,4 gram agarosa ditimbang kemudian dilarutkan dalam 40 ml TBE 0,5x. Memanaskan agarosa menggunakan *microwave* sampai homogen (bening), selanjutnya menambahkan 0,5  $\mu$ l *Gel Red* dan dihomogenkan kembali. Menuangkan agarosa cair pada *tray* atau cetakan yang sudah dipasang sisiran atau *comb*. Sisiran diangkat setelah agarosa menjadi padat (Sambrook & Russel, 2001).

### Elektroforesis gel agarosa

DNA genom sebanyak 2  $\mu$ l dicampurkan dengan 1  $\mu$ l *loading dye*, kemudian memasukkan ke sumur gel agarosa. Menggunakan ladder 1 kb di ujung sebelah kiri atau kanan DNA genom. Running sampel dilaksanakan selama 30 menit pada 100 Volt. Sampel kemudian divisualisasi menggunakan *gel doc* (Sambrook & Russel, 2001).

### Amplifikasi DNA

Dalam proses amplifikasi DNA, digunakan primer SRAP, dengan 7 primer *forward* dan 6 primer *reverse* (Li & Quiros, 2001) sebagaimana yang tercantum pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Primer yang digunakan

No	Primer	Sekuen (5'-3')
1.	Me1F	TGA GTC CAA ACC GGA TA
2.	Me2F	TGA GTC CAA ACC GGA GC
3.	Me3F	TGA GTC CAA ACC GGA AT
4.	Me4F	TGA GTC CAA ACC GGA CC
5.	Me5F	TGA GTC CAA ACC GGA AG
6.	Me7F	TGA GTC CAA ACC GGT CC
7.	Me8F	TGA GTC CAA ACC GGT GC
8.	Em1R	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
9.	Em2R	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
10.	Em3R	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
11.	Em5R	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
12.	Em6R	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
13.	Em7R	GAC TGC GTA CGA ATT CAA

### Skrining primer SRAP

Sampel diuji menggunakan primer SRAP dengan tujuan skrining. Seleksi primer dipilih berdasarkan kemampuan amplifikasi primer dalam menghasilkan fragmen primer dipilih berdasarkan kemampuan amplifikasi primer dalam menghasilkan fragmen DNA, jelas, dan polimorfisme tinggi.

### Amplifikasi sampel

Membuat komposisi *Cocktail* PCR sebanyak 16  $\mu\text{L}$  dengan komposisi template DNA sebanyak 2  $\mu\text{L}$ , primer *reverse* (20  $\mu\text{L}$ ) sebanyak 0.4  $\mu\text{L}$ , primer *forward* (20  $\mu\text{L}$ ) sebanyak 0.4  $\mu\text{L}$ , PCR *Master Mix Green Taq* sebanyak 7.8  $\mu\text{L}$ , dan  $\text{ddH}_2\text{O}$  5,4  $\mu\text{L}$ . Selanjutnya, PCR akan direaksikan dengan beberapa tahap (Tabel 2).

Tabel 2. Tahapan reaksi PCR

No	Fase	Suhu	Waktu
1.	Fase pre-denaturasi	94°C	5 Menit
2.	Fase denaturasi	94°C	1 Menit
3.	Fase penempelan dengan metode <i>touchdown</i>	50-33°C	1 Menit
4.	Fase ekstensi	72°C	1 menit
5.	Fase denaturasi	94°C	1 Menit
6.	Fase penempelan	50°C	1 Menit
7.	Fase ekstensi	72°C	1 menit
8.	Fase ekstensi final	72°C	8 menit
9.	<i> Holding temperature</i>	4°C	15 menit

Tahap kedua sampai tahap keempat dilakukan sebanyak 5 kali siklus, sedangkan tahap kelima sampai tahap ketujuh dilakukan sebanyak 35 kali siklus (Li & Quiros, 2001).

### Elektroforesis Produk PC

#### Pembuatan agarosa 1.5%

Menimbang agarosa sebanyak 1,2 gram dan melarutkan dalam 80 ml TBE 0,5x. Memanaskan agarosa menggunakan *microwave* hingga tercampur (bening) dan menambahkan *Gel Red* 2  $\mu\text{L}$  serta dihomogenkan lagi. Menuangkan agarosa cair dalam cetakan atau *tray* yang sudah dipasang sisiran atau *comb*. Sisiran diangkat saat agarosa menjadi padat (Sambrook & Russel, 2001).

### Elektroforesis gel agarosa

Tangki elektroforesis disiapkan dan menuangkan TBE 0,5x sesuai ukuran tangki. Memasukkan 2  $\mu\text{L}$  DNA hasil PCR kedalam sumuran gel agarosa. Ladder 100 bp digunakan pada ujung sebelah kiri atau kanan DNA hasil PCR. DNA ladder 100 bp digunakan sebagai standar dalam pemisahan fragmen melalui poses elektroforesis. Selama 90 menit running sampel dilakukan pada 100 volt. Sampel kemudian divisualisasi menggunakan *gel doc* (Sambrook & Russel, 2001).

### Skoring dan Analisis DNA

Data hasil hasil *scoring* pita amplifikasi diberi skor yang berbeda, yaitu (1) bila terdapat pita hasil amplifikasi dan (0) bila tidak terdapat pita hasil amplifikasi. Data kemudian dianalisis menggunakan aplikasi NTSYsp. 2.02 (Rohlf, 2005). Nilai kesamaan digunakan untuk menghasilkan dendogram dengan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Average*). Dendogram dikalkulasi dengan program SymQual dengan koefisien jarak dan dibangun dengan algoritma clustering SAHN.

### Hasil dan Pembahasan

#### Koleksi Material DNA

Sampel yang berhasil dikoleksi sebanyak 19 sampel b dari beberapa kecamatan di Kabupaten Pesawaran sebagaimana terlihat pada Tabel 3. Material DNA pisang yang dijadikan sebagai sampel pada penelitian ini dikoleksi dari 6 kecamatan di Kabupaten Pesawaran, diantaranya Kecamatan Negeri Katon, Gedong Tataan, Way Lima, Tegineneng, Way Ratai dan Kedondong. Dasar pemilihan kecamatan tersebut diantaranya Kecamatan Way Ratai mewakili daerah pantai, Kecamatan Gedong Tataan mewakili pusat kota dan merupakan kecamatan dengan produksi pisang tertinggi, dan Kecamatan Tegineneng mewakili kecamatan terpinggir.

Disela ketiga kecamatan tersebut terdapat Kecamatan Negeri Katon, Way Lima, dan Kedondong yang juga dipilih untuk menambah jangkauan lokasi pengambilan sampel, sehingga 6 kecamatan yang dipilih cukup mewakili wilayah Kabupaten Pesawaran. Hasil koleksi didapatkan 19 sampel kultivar pisang diantaranya pisang kepok, pisang janten, pisang

ambon, pisang muli, pisang apuk, pisang ambon lumut, pisang tanduk, pisang tindang, pisang panjang, pisang raja nangka, pisang klutuk, pisang raja bulu, pisang raja sajen, pisang

cavendish, pisang kepok kapas, pisang rejang, pisang byar, pisang raja sereh dan pisang kepok australia. Sampel tersebut kemudian diisolasi untuk didapatkan DNA nya.

**Tabel 3.** Sampel Pisang Kabupaten Pesawaran dan 4 Sampel Pisang Liar

No	Sample Code	Sampling Location	Cultivar	Scientific Name	Genome
1.	A1	Kalirejo, Negeri Katon	Pisang Kepok	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (ABB) cv. 'Pisang Kepok'	ABB
2.	B1	Pejambon, Negeri Katon	Pisang Janten	<i>Musa acuminata</i> (AA) cv. 'Pisang Janten'	AA
3.	D1	Bernung, Gedong Tataan	Pisang Ambon	<i>Musa acuminata</i> (AAA) cv. 'Pisang Ambon'	AAA
4.	E1	Wiyono, Gedong Tataan	Pisang Muli	<i>Musa acuminata</i> (AA) cv. 'Pisang Muli'	AA
5.	F1	Kali Pasir 1, Way Ratai	Pisang Apuk	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (AAB) cv. Pisang Apuk	AAB
6.	G1	Mulyo Sari, Way Ratai	Pisang Ambon Lumut	<i>Musa acuminata</i> (AAA) cv. 'Pisang Ambon Lumut'	AAA
7.	H1	Sungai 2, Kedondong	Pisang Tanduk	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (ABB) cv. 'Pisang Tanduk'	AAB
8.	I1	Rejoagung, Tegineneng	Pisang Tingang	<i>Musa acuminata</i> (AAA) cv. 'Pisang Tingang'	AAA
9.	J1	Rejoagung, Tegineneng	Pisang Panjang	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (AAB) cv. 'Pisang Panjang'	AAB
10.	K1	Rejoagung, Tegineneng	Pisang Raja Nangka	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (AAB) cv. 'Pisang Raja Nangka'	AAB
11.	L1	Sidomaju, Way 5	Pisang Khlutuk	<i>Musa balbisiana</i> (BB) cv. 'Pisang Klutuk'	BB
12.	M1	Banjar Negeri, Way 5	Pisang Raja Bulu	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (AAB) cv. 'Pisang Raja Bulu'	AAB
13.	N1	Sungai Langka, Gedong Tataan	Pisang Raja Sajen	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (AAB) cv. 'Pisang Raja Sajen'	AAB
14.	O1	Sungai 2, Kedondong	Pisang Cavendish	<i>Musa acuminata</i> (AAA) cv. 'Pisang Cavendish'	AAA
15.	P1	Kejadian, Tegineneng	Pisang Kepok Kapas	<i>Musa balbisiana</i> (BBB) cv. 'Pisang Kepok Kapas'	BBB
16.	Q1	Padang Manis, Way 5	Pisang Rejang	<i>Musa acuminata</i> (AA) cv. 'Pisang Rejang'	AA
17.	R1	Bangun Sari, Negeri Katon	Pisang Byar	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (AAB) cv. 'Pisang Byar'	AAB
18.	S1	Sidobasuki, Tegineneng	Pisang Raja Sereh	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (ABB) cv. 'Pisang	ABB

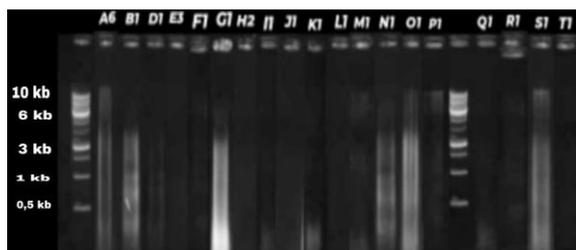
19.	T1	Bangun Sari, Negeri Katon	Pisang Kepok Australi	Raja Sereh' <i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> (ABB) cv. 'Pisang Kepok Australi'	ABB
20.	514	Aketajawe Lolobata National Park, North Maluku	<i>Musa acuminata</i> liar	<i>Musa acuminata</i> (AA)	AA
21.	584	Aketajawe Lolobata National Park, North Maluku	<i>Musa acuminata</i> liar	<i>Musa acuminata</i> (AA)	AA
22.	497	Aketajawe Lolobata National Park, North Maluku	<i>Musa balbisiana</i> liar	<i>Musa balbisiana</i> (BB)	BB
23.	515	Aketajawe Lolobata National Park, North Maluku	<i>Musa balbisiana</i> liar	<i>Musa balbisiana</i> (BB)	BB

Umumnya variasi kultivar pisang yang berhasil dikoleksi dari Kabupaten Pesawaran dapat disebabkan oleh berbagai faktor, seperti keputusan petani pisang dalam budidaya pisang, dimana kegiatan produksinya dipengaruhi oleh hama, penyakit, harga jual, akses pasar dan variabilitas (Apriyani *et al.*, 2018). Kesesuaian lahan untuk budidaya tanaman pisang juga mempengaruhi produksi pisang. Faktor utama yang mempengaruhi kelayakan lahan untuk pengembangan pisang di Kabupaten Pesawaran adalah suhu udara, curah hujan dan kelembaban (Oktavia, 2018). Selain itu lokasi pengambilan sampel, keterbatasan tenaga dan waktu juga dapat mempengaruhi jumlah sampel yang dikoleksi pada penelitian ini.

#### Isolasi DNA Pisang (*Musa spp.*)

Akibat pemisahan DNA pisang dapat diketahui secara kualitatif dengan melihat efek samping elektroforesis gel agarosa yang ditunjukkan dengan munculnya fragmen sebagaimana terlihat pada Gambar 4. Umumnya, elektroforesis hasil isolasi menggunakan kit isolasi *Geneaid* tidak bisa menunjukkan berhasil atau tidaknya isolasi dilakukan, namun dengan melihat fragmen yang dihasilkan, dapat menunjukkan kualitas DNA yang diisolasi. Adanya fragmen menunjukkan DNA hasil isolasi memiliki kualitas yang cukup baik, sedangkan belum terbentuknya fragmen

dapat disebabkan karena kualitas DNA yang terisolasi rendah.



Gambar 2. Elektroforesis DNA Hasil Isolasi

Pelepasan DNA adalah fase terpenting dalam analisis molekuler. Kualitas DNA yang baik pada tanaman dipengaruhi oleh isolasi (Gusmiatri *et al.*, 2020). Isolasi menggunakan kit isolasi *Geneaid* berhasil dilakukan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya fragmen pada saat elektroforesis gel. Elektroforesis adalah teknik yang digunakan untuk penyelidikan, identifikasi, dan sanitasi bagian DNA yang bergantung pada relokasi atau perkembangan partikel bermuatan. Atom DNA yang kecil dapat melewati pori-pori gel agarosa dengan lebih efektif, sedangkan atom DNA yang lebih besar mempunyai lebih banyak kesulitan (Prayoga & Wardani, 2015). Fragmen yang dihasilkan dari proses isolasi memiliki ketebalan yang berbeda-beda.

Sampel A6, B1, G1, N1, O1, dan S1 menghasilkan fragmen tebal, sedangkan sampel D1, E3, F1, H2, I1, J1, K1, L1, M1, P1, Q1, R1,

dan T1 menghasilkan fragmen tipis. Perbedaan ketebalan fragmen yang dihasilkan disebabkan oleh perbedaan konsentrasi dan kualitas DNA yang berhasil diisolasi bervariasi. Kualitas DNA hasil isolasi yang semakin baik akan menghasilkan fragmen yang semakin tebal (Irmawati, 2003). Ketebalan fragmen yang dihasilkan menunjukkan bahwa seluruh DNA yang diisolasi tidak cacat dan tidak terpotong karena perlakuan mekanis selama proses isolasi. Sentralisasi DNA yang terjadi karena siklus pemutusan juga dipengaruhi oleh kontaminan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya *smear* pada

visualisasi elektroforesis. Jenis kontaminan yang mempengaruhi fiksasi DNA antara lain protein dan RNA (Kundu *et al.*, 2011), polisakarida, dan fenol (Kheyrodin & Ghazyinian, 2012).

### Polymerase Chain Reaction (PCR) *Skrining Primer*

Seleksi dari 25 kombinasi primer dipilih berdasarkan kemampuan amplifikasi primer dalam menghasilkan fragmen DNA pada semua sampel, jelas, dan polimorfisme tinggi Tabel 4.

**Tabel 4.** Skrining Kombinasi Primer SRAP

No	Kombinasi Primer	Keterangan
1.	Me2F + Em5R	Muncul pita DNA pada sampel uji
2.	Me2F + Em1R	Muncul pita DNA pada sampel uji
3.	Me3F + Em1R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji
4.	Me2F + Em6R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji
5.	Me3F + Em6R	Muncul pita DNA pada sampel uji
6.	Me7F + Em1R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji
7.	Me2F + Em2R	Muncul pita DNA pada sampel uji namun tidak polimorfisme
8.	Me3F + Em1R	Muncul pita DNA namun hanya pada beberapa sampel uji
9.	Me3F + Em2R	Muncul pita DNA namun hanya pada beberapa sampel uji
10.	Me7F + Em2R	Hanya muncul smear pada beberapa sampel uji
11.	Me3F + Em5R	Muncul pita DNA pada sampel uji
12.	Me1F + Em6R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji
13.	Me1F + Em3R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji
14.	Me8F + Em3R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji
15.	Me2F + Em7R	Muncul pita DNA namun hanya pada beberapa sampel uji
16.	Me3F + Em7R	Muncul pita DNA namun hanya pada beberapa sampel uji
17.	Me8F + Em7R	Muncul pita DNA pada sampel uji
18.	Me8F + Em1R	Muncul pita DNA pada sampel uji
19.	Me4F + Em7R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji
20.	Me5F + Em8R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji
21.	Me5F + Em1R	Muncul pita DNA pada sampel uji
22.	Me5F + Em5R	Muncul pita DNA pada sampel uji
23.	Me2F + Em3R	Muncul pita DNA namun hanya pada beberapa sampel uji
24.	Me4F + Em2R	Muncul pita DNA pada sampel uji
25.	Me4F + Em8R	Tidak muncul pita DNA pada sampel uji

Hasil skrining 25 kombinasi primer menunjukkan bahwa terdapat 9 kombinasi primer diantaranya kombinasi primer nomor 1, 2, 5, 11, 17, 18, 21, 22, dan 24 yang menghasilkan fragmen DNA yang lebih jelas dan polimorfisme lebih tinggi. Primer yang diperoleh digunakan untuk menganalisis PCR pada semua sampel. Analisis keragaman genetik pada kultivar pisang menggunakan pita yang dihasilkan dari 9 kombinasi primer SRAP. Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen

polimorfik yang sangat jelas. Kombinasi primer yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan kombinasi primer yang digunakan Boonsrangsom *et al.*, (2020) dalam menganalisis keragaman genetik pisang menggunakan marka molekuler SRAP. 10 kombinasi primer SRAP yang digunakan Boonsrangsom *et al.*, (2020) diantaranya Me1F+Em6R, Me4F+Em7R, Me4F+Em8R, Me5F+Em1R, Me5F+Em8R, Me6F+Em2R, Me6F+Em3R, Me6F+Em4R, Me6F+Em7R, dan

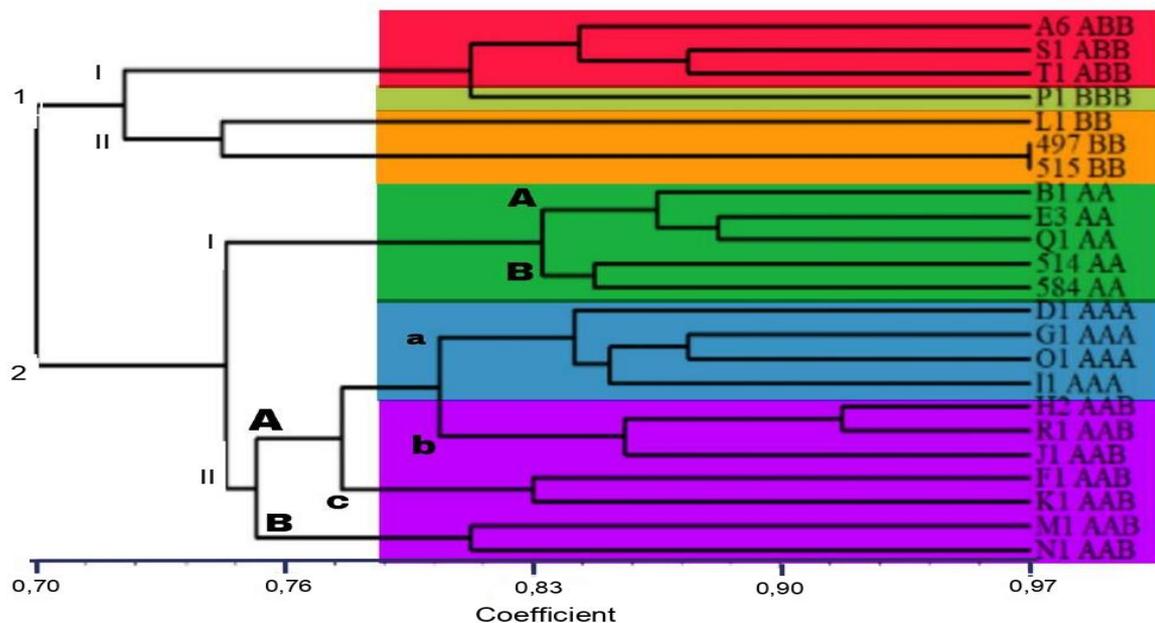
Me6F+Em8F, dan hanya kombinasi primer Me5F+Em1R yang cocok digunakan pada penelitian ini.

Kombinasi primer SRAP yang menghasilkan fragmen polimorfik sehingga digunakan pada penelitian ini diantaranya Me2F+Em5R, Me2F+Em1R, Me3F+Em6R, Me3F+Em5R, Me8F+Em7R, Me8F+Em1R, Me5F+Em1R, Me5F+Em5R, dan Me4F+Em2R. Pemilihan kombinasi primer SRAP didasarkan pada kemampuan amplifikasi primer dalam menghasilkan fragmen DNA pada semua sampel, jelas dan polimorfisme tinggi. Pita polimorfik yang dihasilkan menunjukkan adanya sekuens DNA hasil isolasi yang komplemen dengan primer. Primer yang tidak menghasilkan pita menunjukkan primer tersebut tidak mempunyai sekuens yang homolog dengan sekuens DNA *template* (Syafaruddin & Nasution, 2012), sedangkan keberadaan

amplifikasi pada beberapa primer dapat disebabkan primer yang komplemen dengan sekuens pada DNA *template* (Sulistiyawati & Widyatmoko, 2017).

### Amplifikasi DNA

Sampel kultivar pisang sebanyak 19 dan 4 sampel pisang liar berhasil diisolasi dan diamplifikasi. Hasil visualisasi DNA membuktikan keberhasilan amplifikasi PCR. Visualisasi DNA menunjukkan ada 2 macam kelompok DNA yang dihasilkan, yaitu pita monomorfik dan polimorfik. Pita monomorfik adalah pita yang muncul di semua lokus populasi, sedangkan pita polimorfik adalah pita yang tidak muncul sama sekali di lokus populasi. Bagian yang disampaikan dalam setiap contoh memiliki panjang pasangan basa yang bervariasi, mulai dari 100 bp - 2000 bp.



**Gambar 12.** Dendrogram Hasil Analisis *Clustering* Sembilan belas Sampel Kultivar Pisang dan Empat Sampel Pisang Liar. Keterangan: A6) Pisang Kepok, B1) Pisang Janten, D1) Pisang Ambon, E3) Pisang Muli, F1) Pisang Apuk, G1) Pisang Ambon Lumut, H2) Pisang Tanduk, I1) Pisang Tindang, J1) Pisang Panjang, K1) Pisang Raja Nangka, L1) Pisang Klutuk, M1) Pisang Raja Bulu, N1) Pisang Raja Sajen, O1) Pisang Cavendish, P1) Pisang Kepok Kapas, Q1) Pisang Rejang, R1) Pisang Byar, S1) Pisang Raja Sereh, T1) Pisang Kepok Australia, 497 dan 515) *Musa balbisiana* liar, 514 dan 584) *Musa acuminata* liar

Sekuen yang tidak cocok dengan primer yang digunakan pada sampel mengakibatkan tidak munculnya fragmen. Produk PCR dengan 9 primer SRAP menghasilkan 204 lokus berpola polimorfik. Pita polimorfik sebanyak 167 dari

204 lokus dan 37 lokus termasuk pita monomorfik. Pita tersebut menunjukkan primer SRAP yang digunakan mempunyai kesamaan dengan DNA *template* hasil isolasi daun pisang. Banyak sedikitnya lokus yang dihasilkan

bergantung pada banyaknya sekuens DNA primer yang homolog dengan sekuens DNA sampel (Syafaruddin & Nasution, 2012).

### **Keragaman Genetik**

Keragaman genetik 19 sampel pisang menggunakan sembilan kombinasi primer SRAP disajikan pada Gambar 6. Koefisien kemiripan berkisar 70-97% atau dengan nilai keragaman sebesar 0-27%. Presentasi kemiripan tersebut menunjukkan pengelompokan dua *cluster* besar. *Cluster* 1 terbagi menjadi dua sub *cluster* dengan kemiripan sebesar 72%. Sub *cluster* II merupakan sampel dengan genom ABB dan genom BBB sedangkan sub *cluster* II merupakan sampel dengan genom BB. *Cluster* 2 terbagi menjadi dua sub *cluster* dengan kemiripan sebesar 75%. Sub *cluster* I merupakan sampel dengan genom AA sedangkan sub *cluster* II merupakan sampel dengan genom AAA dan AAB.

Analisis *clustering* berdasarkan marka molekuler SRAP menghasilkan dendogram yang membagi 19 sampel kultivar pisang dan 4 sampel pisang liar menjadi 2 *cluster* besar. *Cluster* 1 terdiri dari 2 sub *cluster*. Sub *cluster* I merupakan kelompok pisang kultivar dengan genom ABB diantaranya pisang kepok, pisang raja sereh, dan pisang kepok australia dan genom BBB yaitu pisang kepok kapas. Sub *cluster* II merupakan kelompok pisang dengan genom BB diantaranya pisang klutuk dan pisang liar *Musa balbisiana*. *Cluster* 2 terdiri dari 2 sub *cluster*. Sub *cluster* I terbagi menjadi 2 bagian, bagian A merupakan kelompok pisang kultivar dengan genom AA diantaranya pisang janten, pisang muli dan pisang rejang. Sedangkan bagian B merupakan kelompok pisang liar dengan genom AA yaitu *Musa acuminata*. Sub *cluster* II terdiri dari 2 bagian, bagian A terbagi lagi menjadi 3 kelompok.

Kelompok a terdiri dari pisang dengan genom AAA, diantaranya pisang ambon, pisang ambon lumut, pisang cavendish dan pisang tingang. Kelompok b terdiri dari pisang dengan genom AAB diantaranya pisang tanduk, pisang byar, dan pisang panjang. Kelompok c juga terdiri dari pisang dengan genom AAB diantaranya pisang apuk dan pisang raja nangka. Bagian B terdiri dari pisang raja bulu dan pisang raja sajen dengan genom AAB. Analisis *clustering* berdasarkan marka molekuler SRAP

mampu mengelompokkan sampel berdasarkan genomnya, hal tersebut sejalan dengan sistem klasifikasi pisang budidaya yang diusung oleh Simmonds & Sheperd (1955).

Penelitian keragaman genetik antar kultivar pisang berdasarkan marka molekuler SRAP yang dilakukan oleh Boonsransom dkk. (2020) juga mengelompokkan sampel pisang berdasarkan genomnya, dimana dendogram yang dihasilkan membagi 16 sampel pisang kedalam 2 *cluster* besar. *Cluster* 1 terbagi menjadi 2 bagian, dimana bagian I merupakan kelompok pisang dengan genom ABB dan bagian II merupakan kelompok pisang dengan genom BB. *Cluster* 2 juga terbagi menjadi 2 bagian, dimana bagian I dan bagian II merupakan sampel pisang dengan genom AA. Hasil dendogram menunjukkan pemilihan kombinasi primer SRAP yang cocok sehingga hasil visualisasi DNA terlihat dan terbaca dengan jelas.

Nilai kemiripan diperoleh sebesar 0,70-0,97 atau nilai keragaman sebesar 0-0,27 menggunakan analisis genetik marka SRAP. Nilai tersebut berarti keragaman genetik pisang di Kabupaten Pesawaran termasuk dalam kategori rendah. Nilai keragaman genetik secara turun temurun dipisahkan menjadi 3 kategori, antara lain rendah mulai dari 0,1 - 0,4, sedang mulai dari 0,5 - 0,7, dan tinggi mulai dari 0,8 - 1,0 (Sulistiyawati & Widyatmoko, 2017). Semakin kecil nilai keragaman makan semakin dekat kekerabatan sampel yang diuji (Vika *et al.*, 2015). Semakin kecil (mendekati 0) nilai koefisien kemiripan genetik maka semakin jauh atau semakin besar jarak genetik (mendekati 1) hubungan kekerabatan antar aksesi (Indrawati *et al.*, 2015). Sampel yang kemiripan tinggi mengindikasikan kondisi tempat tumbuhnya sama atau menyerupai (Shafie *et al.*, 2011).

### **Kesimpulan**

Keragaman genetik pisang (*Musa* spp.) di Kabupaten Pesawaran dengan marka *Sequence Related Amplified Polymorphism* (SRAP) termasuk dalam kategori rendah, yaitu pada rentang 0-0,27. Keragaman genetik menggunakan marka *Sequence Related Amplified Polymorphism* (SRAP) menghasilkan fragmen polimorfik pada 9 kombinasi primer. Hubungan kekerabatan pisang berdasarkan

marka *Sequence Related Amplified Polymorphism* (SRAP) membagi 19 sampel kultivar pisang dan 4 sampel pisang liar menjadi 2 *cluster* besar dengan nilai koefisien kesamaan antara 0,70-0,97.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan pada Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi (PRBE-BRIN) yang sudah memberikan izin dan memfasilitasi penelitian di laboratorium.

### Referensi

- Apriyani, M., Saty, F. M., & Aslina, E. (2018). Faktor yang Mempengaruhi Keputusan Petani Pisang di Lampung. *Prosiding Seminar Nasional Pengembangan Teknologi Pertanian*. 68(9): 45-50. DOI: <https://doi.org/10.25181/prosemnas.v2018i0.1139>
- Badan Pusat Statistika. (2021). Produksi Buah-buahan Menurut Kabupaten/Kota dan Jenis Tanaman (Kuintal). *lampung.bps.go.id*. Diakses pada tanggal 11 November 2022.
- Badan Pusat Statistika. (2022). Produksi Tanaman Buah-buahan. *www.bps.go.id*. Diakses pada tanggal 25 Juni 2023.
- Boonsrangsom, T., Phetnin, B., Ratnasut, K., & Sujipuli, K. (2020). Assesment of Genetic Diversity among *Musa* Cultivars Based on Sequence-Related Amplified Polymorphism Technique. *Naresuan University Journal: Science and Tecnology (NUJST)*. 28(2): 52-61. DOI: <https://doi.org/10.14456/nujst.2020.15>
- Gusmiatri., Nurhafidah., & Larekeng, S.H. (2020). Description of Correlation between Quantitative and Qualitative Assays on Candlenut DNA. *IOP Conferences Series: Earth and Environmental Science. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Global Issue for Infrastructure, Environment & Socie Economic Development*. 473(1).1315-1755. DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/473/1/012116>
- Indhirawati, R., Purwantoro, A., Basunanda, P. (2015). Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Jagung Berondong Stroberi dan Kuning (*Zea mays* L. Kelompok Everta). *Vegetalika*. 4(1): 102-104. DOI: <https://doi.org/10.22146/veg.6427>
- Irmawati. (2003). *Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama pada Stok Hetchery*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kheyrodin, H., & Ghazvinian, K. (2011). DNA Purification and Isolation of Genomic DNA from Bacterial Species by Plasmid Purification System. *African Journal Agrucultural Research*. 7: 433-442. DOI: 10.5897/AJAR11.1370
- Kundu, A. Sarkar, D., Bhattacharjee, A., & Topdar, N. (2011). A Simple Ethanol Wash of the Tissue Homogenates Recovers High-Quality Genomic DNA from *Corchorus* Species Characterized by Highly Acidic and Proteinaceous Mucilages. *Electron J Biotechnol*. 14: 1-7. DOI: 10.2225/vol14-issue1-fulltext-4
- Li, G., & Quiros, C. F. (2001). Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP). A New Marker System Based on a Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*. 103: 45-461. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220100570>
- Oktavia, N. (2018). *Analisis Kesesuaian Lahan untuk Tanaman Pisang (Musa acuminata colla) di Kabupaten Pesawaran Berbasis Sistem Informasi Geografis dan Interpretasi Citra Landsat 8 Oli*. Bandarlampung. Universitas Lampung.
- Ortiz, R & D. Vuylsteke. (1994). Factor Influencing Seed Set in Triploid *Musa* spp. L. and Production of Euploid Hibrids. *Annals of Botany*. 75: 151-155. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbo.1995.1006>
- Prayoga, W., & Wardani, A. K. (2015). PCR untuk deteksi *Salmonella* sp. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(2): 483-488).
- Rohlf, J. F. (2005). *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. State University of New York. New York.
- Sambrook, J., & Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)* Vol. 2. New York (US): Spring Harbor Laboratory Press.

- Shafie, S. B., Hasan, S. M. Z., Zain, A. M., Shah, R. M. (2011). RAPD dan ISSR Marker Comparative Analysis of Genetic Diversity in Wormwood Capillary (*Artemisia Capillaris*) from Negeri Sembilan, Malaysia. *Journal Medicinal Plants Research*. 5(1): 4426-4437. DOI: <https://doi.org/10.5897/JMPR.9001072>
- Simmonds, N. W. (1962). *The Evolution of the Bananas*. Longmans, Green and Co. Ltd, London.
- Simmonds, N. W., & Shepherd, K. (1955). The Taxonomy and Origins of the Cultivated Banana. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*. 50: 302-312. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x>
- Sulistiyawati, P., & Widyatmoko, A. Y. P. B. C. (2017). Keragaman genetik Populasi Kayu Merah (*Pterocarpus indicus* Willd) menggunakan marka Random Amplified Polymorphism DNA. *Jurnal Pemuliaan Tanaaman Hutan*. 11(1): 67-76. DOI: <https://doi.org/10.20886/jpth.2017.11.1.67-76>
- Syafaruddin, & Nasution, M. A. 2012. Keragaman 17 Aksesori Plasma Nutfah Kakao berdasarkan Marka Morfologi dan Molekuler. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 3(2): 177- 184. DOI: <https://dx.doi.org/10.21082/jtidp.v3n2.2012.p177-184>
- Vika, T. O., Purwantoro, A., & Wulandari. (2015). Keragaman Genetik pada Tanaman Lili Hujan (*Zephyranthes* spp.). *Vegetalika*. 4(2): 70-77. DOI: <https://doi.org/10.22146/veg.6424>