

**STUDI RESISTENSI TIGA KULTIVAR PISANG KEPOK OLEH
KOLKISIN TERHADAP
BLOOD DISEASE BACTERIUM (BDB)**

(Disertasi)

Oleh

**ETI ERNAWIATI
NPM. 1737061004**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

STUDI RESISTENSI TIGA KULTIVAR PISANG KEPOK OLEH KOLKISIN TERHADAP *BLOOD DISEASE BACTERIUM* (BDB)

Oleh

ETI ERNAWIATI

Pisang kepok merupakan kultivar pisang lokal yang sangat prospektif untuk dikembangkan, namun rentan terhadap serangan hama dan penyakit karena pisang kepok memiliki bunga jantan yang disukai serangga vektor penyakit. Pemuliaan mutasi menggunakan kolkisin diharapkan dapat menginduksi ketahanan pisang kepok terhadap patogen adalah tujuan dan kebaruan (*novelty*) penelitian ini. Penelitian di rumah kaca disusun secara faktorial dalam Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 5 ulangan dan ulangan sebagai kelompok. Faktor 1 terdiri dari 2 level, yaitu tanpa diberi penambahan sebagai kontrol (A1), dan penambahan kolkisin sintesis 0,1% (A2). Faktor 2 adalah 3 kultivar pisang kepok, yaitu kepok abu (KA), kepok batu (KB) dan kepok kuning (KK). Data kuantitatif hasil pengukuran semua parameter yang diamati di analisis Sidik Ragam dan jika ada perbedaan dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf 5%, sedangkan data kualitatif ditelaah menggunakan analisis perbandingan antara data hasil tanaman yang diperlakukan dengan tanaman kontrol. Hasil pengamatan menunjukkan kepok batu memberikan respon paling baik dibandingkan kepok abu dan kepok kuning. Hal ini dapat dilihat pada karakter sel yang mengalami mixoploid dan c-mitosis lebih banyak, indeks mitosis dan indeks stomata lebih kecil, merespon infeksi inokulum BDB lebih baik dari serangan penyakit BDB yang ditunjukkan dengan kandungan senyawa fenol dan enzim peroksidase lebih banyak. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kolkisin 0,1% mampu menginduksi sifat anti patogenitas pada pisang kepok dan merupakan kebaruan yang diperoleh dari penelitian ini. Pisang kepok batu yang diberi kolkisin 0,1% menunjukkan potensi sebagai kultivar yang tahan terhadap patogen BDB.

Kata Kunci: anti patogenitas, *blood disease bacterium*, kolkisin, pisang kepok

ABSTRACT

RESISTANCE STUDY ON THREE COLCHICINE-TREATED KEPOK BANANA CULTIVARS AGAINST *BLOOD DISEASE BACTERIUM (BDB)*

By

ETI ERNAWIATI

Pisang kepok is a local banana cultivar that is very prospective to be developed, but is susceptible to pest and disease attacks because the male flowers of pisang kepok are favored by disease vector insects. Plant breeding by mutation using colchicine expected to induce kepok banana resistance to pathogens is the objective and novelty of this study. The research was conducted in a greenhouse in a factorial experiment in a Randomized Group Design (RGD) with 5 replicates, and replicated as a group. Factor 1 consisted of 2 treatment levels, namely media without the addition of colchicine as control (A1), and with the addition of 0,1% colchicine (A2). Factor 2 was 3 cultivars of kepok banana, namely kepok abu (KA), kepok batu (KB) and kepok kuning (KK). Quantitative data obtained were analyzed for variance using ANOVA followed by DMRT test at the 5% level, while qualitative data were examined using comparative analysis to compare with data on control plants. The results showed that kepok batu gave the best response to colchicine treatment compared to kepok abu and kepok kuning, which can be seen based on the greater number of mixoploid and c-mitotic cells, mitotic index, smaller stomatal index, and better response to BDB inoculum infection indicated by higher content of phenol compounds and peroxidase enzymes. These results it can be concluded that 0,1% colchicine is able to induce anti-pathogenic properties in kepok banana. Thus, the novelty obtained in this study is that banana kepok batu treated with 0,1% colchicine shows potential as a cultivar resistant to the BDB pathogen.

Keywords: anti-pathogenicity, blood disease bacterium, colchicine, kepok banana

**STUDI RESISTENSI TIGA KULTIVAR PISANG KEPOK
OLEH KOLKISIN TERHADAP
BLOOD DISEASE BACTERIUM (BDB)**

Oleh

ETI ERNAWIATI

Disertasi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
DOKTOR MIPA**

pada

**Program Pascasarjana Doktor MIPA
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Disertasi : **Studi Resistensi Tiga Kultivar Pisang Kepok oleh Kolkisin Terhadap *Blood Disease Bacterium* (BDB)**

Nama Mahasiswa : **Eti Ernawati**

No Pokok Mahasiswa : **1737061004**

Program Studi : **Doktor MIPA**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

Komisaris Promotor

Promotor

Ko-Promotor 1

Rochmah Agustrina, Ph.D.
NIP. 19610803 198903 2 001

Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D.
NIP. 19590706 198811 1 001

Ko-Promotor 2

Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.
NIP. 19650303 199203 1 001

Direktur Pascasarjana,
Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP. 19640326 198902 1 001

Ketua Program Studi S3 MIPA,

Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc.
NIP. 19610311 198803 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Promotor : Rochmah Agustrina, Ph.D.

Ko-Promotor 1 : Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D.

Ko-Promotor 2 : Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.

Sekretaris Prodi : Dr. Khoirin Nisa, S.Si., M.Si.

Penguji Internal 1 : Dr. Sri Wahyuningsih, M.Si.

Penguji Internal 2 : Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed.

Penguji Eksternal : Dr. Bayu Adjie, M.Sc.

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam


Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 19711001 200501 1 002

Tanggal Lulus Ujian : 03 Mei 2024

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN

A. Judul Disertasi : Studi Resistensi Tiga Kultivar Pisang Kepok
Oleh Kolkisin Terhadap *Blood Disease*
Bacterium (BDB)

B. Bidang Ilmu : Ilmu Biologi

1. Ketua

- a. Nama : Eti Ernawati
 - b. Gol/Pangkat/NPM : IV B/Pembina TK. 1/1737061004
 - c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 - d. Fakultas/Bagian : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam /
Ilmu Biologi
 - e. Universitas : Universitas Lampung
2. Anggota Peneliti : 4 (empat) orang
3. Lokasi Penelitian : Kota Bandar Lampung

Bandar Lampung, 03 Mei 2024

Mengetahui,
Dekan Fakultas MIPA Unila,

Dr. Etim Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 19711001 200501 1 002

Peneliti,



Eti Ernawati
NPM. 1737061004

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Eti Ernawati
NPM : 1737061004
Program Studi : Doktor MIPA
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya di dalam disertasi ini yang berjudul

“STUDI RESISTENSI TIGA KULTIVAR PISANG KEPOK OLEH KOLKISIN TERHADAP *BLOOD DISEASE BACTERIUM* (BDB)”

tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi lain dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam disertasi ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Bandar Lampung, 03 Mei 2024

Yang Menyatakan,



Eti Ernawati
NPM. 1737061004

RIWAYAT HIDUP



Promovenda Eti Ernawati dilahirkan di Cirebon pada tanggal 12 Agustus 1964. Promovenda dilahirkan sebagai anak kedua dari Tujuh bersaudara dari pasangan (Alm.) Bapak Syamsi dan (Almh.) Ibu Arni. **Promovenda** menyelesaikan pendidikan dasar di SD N Bringin – Cirebon pada tahun 1976. Kemudian pendidikan tingkat menengah di SMP N Arjawinangun – Cirebon di tahun 1980 dan menyelesaikan pendidikan tingkat atas di SMA N Palimanan – Cirebon di tahun 1983.

Kemudian **Promovenda** melanjutkan studi S1 di Fabio UNSOED program studi Botani. Selanjutnya di tahun 1998 Promovenda meneruskan studi ke jenjang Magister (S-2) di UNPAD program studi Ilmu Tanaman dengan bidang kajian pemuliaan tanaman dan lulus pada tahun 2002. Kemudian tahun 2017, Promovenda melanjutkan studi Doktor di Program Studi Doktor Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dan mengambil topik riset pada bidang Biologi.

Prestasi bidang akademik yang telah diperoleh oleh **promovenda** yaitu pernah mendapatkan hibah penelitian dan pengabdian kepada masyarakat program hibah Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi diantaranya sebagai berikut:

1. Tahun 2010 dan 2011 **Promovenda** mendapatkan hibah penelitian pada skema Hibah Bersaing DIKTI.
2. Tahun 2017 dan 2018 **Promovenda** memperoleh hibah DIPA dan Hibah Unggulan FMIPA Unila.
3. Tahun 2020 - 2021 **Promovenda** mendapatkan hibah BLU Unila.
4. Tahun 2024 **Promovenda** mendapatkan hibah BLU Unila skema MBKM.

Hasil penelitian **promovenda** selama studi di S3 MIPA Universitas Lampung, **promovenda** telah memiliki artikel yang telah **Accepted** pada jurnal internasional terindeks Scopus Q3.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah Swt., atas karunia dan limpahan rahmat-Nya sehingga disertasi yang berjudul “Studi Resistensi Tiga Kultivar Pisang Kepok oleh Kolkisin Terhadap *Blood Disease Bacterium* (BDB)” dapat diselesaikan sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Doktor di Universitas Lampung. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad saw., suri tauladan bagi seluruh umat Islam, dan semoga syafaatnya selalu tercurah bagi kita semua.

Penulis menyadari bahwa penyusunan disertasi ini melibatkan bantuan banyak pihak, oleh karena itu dengan setulus-tulusnya penulis menghaturkan terima kasih yang tidak terhingga kepada :

1. Rochmah Agustrina, Ph.D. selaku Promotor, yang telah memberikan bimbingan terbaiknya, motivasi, kesabaran yang luas, waktu yang panjang dalam menemani dan menyemangati selama proses penelitian sampai penyusunan disertasi;
2. Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D. selaku Ko-promotor 1, yang telah membimbing dan memotivasi, serta masukan-masukan cerdasnya untuk penyusunan disertasi yang lebih baik;
3. Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc. selaku Ko-promotor 2, atas motivasi dan ide-ide dalam diskusi yang mencerahkan sehingga penyusunan disertasi menjadi lebih baik;
4. Dr. Sri Wahyuningsih, M.Si. selaku Penguji Internal 1, atas saran-saran dan ketelitiannya yang luar biasa untuk penyempurnaan disertasi ini;
5. Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed. selaku Penguji Internal 2, atas masukan-masukan yang mencerahkan bagi penyusunan disertasi ini;

6. Dr. Bayu Adjie, M.Sc. selaku Penguji Eksternal dari Pusat Riset Biodiversitas dan Evolusi BRIN Cibinong – Bogor, yang telah berkenan dan meluangkan waktu untuk memberikan masukan-masukan kepada penulis;
7. Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan FMIPA yang telah memberikan motivasi dan dukungan fasilitas penelitian dan administrasi sampai disertasi terwujud dengan baik;
8. Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc. selaku Ketua Program Studi Doktor MIPA, atas bantuan, motivasi dan arahnya;
9. Drs. Abdul Rosyid, M.M., Eros Fatta Zarkasyi Adha, dan Aulia Nurussyafna, suami dan anak-anak tercinta atas segala bantuan, motivasi dan pendampingan yang terbaik selama penulis menempuh studi sampai lulus;
10. Ayahanda Samsi dan ibunda Arni, yang telah menyemaikan benih ilmu, menumbuhkan dan merawatnya sampai penulis berada pada tahap ini, semoga menjadi amalan yang diterima dan mengalirkan pahala-Nya.
11. Dosen dan mahasiswa Jurusan Biologi FMIPA Unila, baik yang terlibat langsung maupun tidak langsung dalam penelitian dan penulisan disertasi ini;
12. Teman-teman Program Studi Doktor MIPA angkatan 2017, yang telah kebersamai untuk waktu yang panjang dengan kekompakan dan semangat yang tidak surut;
13. Seluruh sivitas akademika Universitas Lampung yang tidak dapat dituliskan satu per satu, atas bantuannya.

Semoga Allah SWT mencatat dan membalasnya dengan kebaikan yang berlimpah bagi kita semua. Demikian juga, semoga disertasi ini memberikan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang perbaikan tanaman untuk masa depan, Aamiin.

Bandar Lampung, 03 Mei 2024

Eti Ernawati

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
RIWAYAT HIDUP	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	8
1.3. Kerangka Teori	8
1.4. Manfaat Penelitian	10
1.5. Kebaruan Penelitian (<i>Novelty</i>)	10
1.6. Hipotesis Penelitian	11
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	12
2.1. Tinjauan Tentang Pisang Secara Umum	12
2.2. Biologi Pisang Kepok	13
2.3. Kendala Budidaya Pisang Kepok.....	15
2.4. Biologi Penyakit Darah Bakteri (Blood Diseases Bacterium/BDB)..	16
2.5. Resistance Gene Analogues (RGAs)	22
2.6. Pengembangan Kultivar Pisang Kepok Tahan Penyakit Darah Bakteri.....	24
2.6.1. Pemuliaan Mutasi.....	25
2.6.2. Agen Mutasi (Mutagen).....	26
2.6.3. Kolkisin.....	27
III. METODE PENELITIAN	31
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	31

3.2. Bahan dan Alat.....	31
3.3. Rancangan Percobaan	33
3.3.1. Rancangan Perlakuan.....	33
3.3.2. Tata Letak Percobaan.....	33
3.4. Bagan Alir Penelitian.....	34
3.5. Prosedur Kerja	35
3.5.1. Pembuatan Larutan untuk Perlakuan	35
3.5.2. Kultur Jaringan Pisang Kepok	35
3.5.3. Infeksi Planlet dengan Inokulum BDB	37
3.5.4. Pengamatan Parameter	38
3.6. Analisis Data	46
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	48
4.1. Karakterisasi Sitologi.....	48
4.2. Karakterisasi Anatomi	53
4.3. Karakterisasi Molekuler	58
4.4. Karakterisasi Ketahanan terhadap Penyakit.....	60
V. KESIMPULAN	72
5.1. Kesimpulan	72
5.2. Saran	72
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN.....	90

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kebaruan Penelitian	10
2. Kisaran Jumlah Kromosom Pisang Kepok 3 x = 33	48
3. Munculnya Gejala Penyakit dalam Rata-rata Hari Setelah Infeksi (HSI)	60
4. Tingkat Kejadian Serangan BDB (%) pada Pisang Kepok.....	62
5. Kandungan Enzim Peroksidase pada Pisang Kepok Setelah Diinfeksi Inokulum BDB (μ M)	68
6. Hasil Analisis Ragam Variabel Indeks C-Mitosis	91
7. Hasil Analisis Ragam Variabel Indeks Mitosis Planlet Pisang Kepok	91
8. Hasil Analisis Ragam Variabel Indeks Stomata Daun Pisang Kepok	92
9. Hasil Analisis Ragam Variabel Kandungan Fenol	92
10. Hasil Analisis Ragam Variabel Kandungan Enzim Peroksidase	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerusakan tanaman pisang akibat serangan BDB	19
2. Kerusakan jaringan vaskular dan buah pisang akibat serangan BDB.....	20
3. Tata letak satuan percobaan di rumah kaca	33
4. Bagan alir penelitian	34
5. Persentase c-mitosis pada planlet pisang kepok yang diberi perlakuan penambahan kolkisin 0,1 % pada media <i>in vitro</i>	49
6. Nilai rata-rata indeks mitosis sel ujung akar planlet pisang kepok akibat penambahan kolkisin 0,1 % pada media <i>in vitro</i>	50
7. Ukuran panjang dan lebar rata- rata stomata dan sel epidermis daun pisang kepok yang diberi penambahan kolkisin 0,1 % pada media kultur <i>in vitro</i> (µm)	54
8. Nilai rata-rata indeks stomata daun pisang kepok yang ditumbuhkan pada media kultur <i>in vitro</i> tanpa diberi bahan tambahan dan diberi penambahan kolkisin 0,1 %	55
9. Hasil penajajaran situs SNP pada RGA dari pisang kepok antara kontrol (awal) dan perlakuan kolkisin sintetis 0,1%.....	59
10. Kandungan senyawa fenol pada akar pisang kepok yang diinfeksi suspensi bakteri penyebab penyakit BDB.....	63
11. Stomata dan sel epidermis daun pisang kepok	94
12. Berbagai gejala yang muncul pada daun pisang yang terinfeksi BDB	95

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pisang merupakan buah favorit masyarakat dunia, sumber makanan pokok yang sangat baik dan dapat menjadi sumber makanan diet seimbang bagi orang-orang di segala umur. Selain itu, pisang berkontribusi besar terhadap pendapatan individu melalui produksi pemanenan, pengolahan, dan pemasaran. Pisang dapat diolah dalam berbagai cara, memiliki nutrisi lengkap dan dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Pisang sangat adaptif terhadap lingkungan terutama pada kondisi kekeringan, berbuah sepanjang tahun sehingga menjadi sumber bahan makanan yang tersedia sepanjang tahun tanpa mengenal musim dan sangat penting untuk program ketahanan pangan terutama bagi masyarakat pedesaan di negara-negara berkembang (Megia, 2005; Droc *et al.*, 2013; Jyothirmayi and Rao, 2015; Hapsari dan Lestari, 2016). Bahkan Till *et al.* (2010) mencatat dari FAOSTAT tahun 2010 bahwa genus *Musa*, meliputi pisang olahan dan pisang konsumsi yang dapat dimakan menempati peringkat teratas di antara 20 tanaman pangan dalam hal produksi di seluruh dunia.

Salah satu pisang Indonesia yang memiliki keragaman aksesori tinggi adalah pisang kepok. Retnoningsih dkk. (2010) mencatat dari koleksi Diperta Yogyakarta terdapat 15 aksesori pisang kepok. Penelitian Ernawati dkk. (2018) di kota Bandar Lampung, provinsi Lampung diperoleh 6 aksesori pisang kepok. Pisang kepok mempunyai karakter antara kedua spesies liar leluhur mereka *Musa acuminata* dan *Musa balbisiana*. Menurut

Meitha dkk. (2020) saat ini, keragaman genetik pisang kepok di Indonesia belum teridentifikasi dengan baik. Meskipun pisang Saba (pisang kepok) telah lama menjadi sumber nutrisi penting bagi penduduk setempat, namun budidayanya masih banyak dilakukan secara tradisional. Keterbatasan pengetahuan tentang genom pisang berdampak pada banyak aspek pemuliaan dan seleksi yang tidak dapat diterapkan. Sifat partenokarpi, sterilitas, dan ploidi adalah beberapa kendala pada pemuliaan dan seleksi pisang (Mancho-Sanchez *et al.*, 2015).

Secara umum produktivitas pisang kepok yang dikembangkan masyarakat masih sangat rendah. Rendahnya produktivitas tersebut disebabkan beberapa hal, yaitu teknik budidaya yang tidak tepat serta gangguan hama dan penyakit yang tinggi. Ada dua penyakit berbahaya dan mematikan pada pisang, yaitu layu bakteri yang menyebabkan penyakit darah bakteri/BDB dan layu fusarium. Pisang tipe plantain, seperti pisang kepok mudah terserang penyakit BDB dibandingkan pisang jenis lainnya. Hal ini disebabkan kandungan kadar gula bunga jantannya yang tinggi sehingga sangat disukai serangga pengunjung. Selain itu, saat mekar bunga jantan yang terbuka tidak dilindungi oleh daun pelindung (braktea) menjadi akses alami bagi BDB (Bloome *et al.*, 2017; Eden-Green, 1994).

Penyakit darah bakteri (BDB) merupakan penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri yang menyerang jaringan vaskular pisang. Nama tersebut diadopsi karena tetesan cairan putih susu, kuning atau merah- coklat kental yang sering keluar dari jaringan vaskular tanaman yang terinfeksi yang terlihat pada permukaan batang tanaman yang terpotong. Penyakit ini menjangkit kultivar kelompok genom AAA dan ABB (Davis *and* Liberato, 2006). Cairan putih kecoklatmerahan muncul dari permukaan batang semu yang dilukai dan buah yang terinfeksi (Kusumoto *et al.*, 2004). Pendapat serupa mengatakan bahwa jika jaringan vaskular tanaman yang sehat dipotong maka akan memancarkan tetesan cairan warna putih sedangkan jaringan vaskuler yang terinfeksi bakteri darah akan berubah menjadi merah

kecoklatan atau hitam. Perubahan warna jaringan vaskular tersebut dapat ditelusuri dari tangkai turun ke tandan buah (Eden-Green, 1994).

Upaya pencegahan dan pengendalian penyakit darah bakteri telah dilakukan, baik secara mekanik dengan perbaikan teknik budidaya, kimiawi dengan pestisida kimiawi dan pestisida nabati (Efri dan Aeny, 2004), dan biologis dengan aplikasi antiserum monospesifik (Baharudin dkk., 1994), FAM-PU10 dan Glomus Tipe 1 (Suswati dkk., 2011 dan 2015). Pisang kepok yang tahan terhadap penyakit darah bakteri terbentuk melalui mutasi spontan (alami) seperti yang terdapat di Sulawesi Selatan. Pisang ini secara alami tidak memiliki bunga jantan (jantung) sehingga tahan (*escape*) terhadap penyakit darah bakteri. Selanjutnya, Pemerintah Daerah Sulawesi Selatan bekerjasama dengan PKBT IPB mengembangkan dan melepas varietas unggul tersebut dan diberi nama pisang “Unti Sayang” dan pisang “Amorang” di Maluku dan Papua (Suhartanto dkk., 2010; Poerba dkk., 2012). Namun dari fakta selanjutnya di lapangan didapatkan bahwa mutasi alami yang terjadi pada pisang unti sayang ternyata dapat mengalami mutasi balik (*recovery*) karena adanya gen pemulih sehingga pisang ini mempunyai bunga jantan kembali (Naipopos dkk., 2014). Dengan demikian, pisang unti sayang ini sangat dimungkinkan kembali rentan terhadap penyakit darah bakteri.

Tumbuhan telah mengembangkan sistem pertahanan yang kompleks terhadap beragam hama dan patogen. Reseptor tanaman memulai jalur sinyal yang mendorong ekspresi gen respons pertahanan. Sistem kekebalan tanaman mengandalkan kemampuannya untuk mengenali molekul musuh, melakukan transduksi sinyal, dan merespons secara defensif melalui jalur yang melibatkan banyak gen dan produknya. Sedangkan patogen secara aktif berusaha menghindari dan mengganggu jalur respons, memilih sistem kekebalan multikomponen yang terdesentralisasi. Desentralisasi sistem kekebalan tanaman membuka peluang evolusioner peningkatan untuk resistensi patogen, serta

mekanisme tambahan untuk penghambatan patogen terhadap respons pertahanan tersebut (Andersen *et al.*, 2018)

Pada awal abad ke-20, pengetahuan tentang heritabilitas dan genetika memungkinkan para peneliti untuk mengidentifikasi sumber resistensi yang diwariskan, yang disebut gen resistensi (gen R). Ketahanan tanaman bergantung pada sistem pengaturan kompleks yang mengontrol respons pertahanan tanaman, yang sangat bergantung pada struktur sederhana model gen-untuk-gen HH Flor (gen R). Komponen sistem kekebalan tanaman berperan dalam deteksi patogen, transduksi sinyal, atau respons pertahanan (Andersen *et al.*, 2018).

Dari beberapa sumber Backiyarani *et al.* (2013) mencatat bahwa gen ketahanan hama dan penyakit (gen R) terdiri dari sekelompok besar dan beragam pada genom tanaman. Berdasarkan fitur molekuler umum, gen R secara garis besar dapat dibagi menjadi setidaknya lima kelas struktural. Salah satunya Gen dari kelas NBS - LRR yang tahan terhadap patogen bakteri, jamur dan virus, hama kutu daun dan nematode. Selain NBS-LRR dan gen R lainnya disusun dalam kelompok besar dan luas dalam genom. Namun, Backiyarani *et al.* (2013) juga mencatat bahwa gen NBS-LRR dan *Resistance Gene Analogues* (RGAs) merupakan penanda resistensi yang berbeda.

Analog gen ketahanan tanaman (RGA), termasuk kandidat gen resistensi (R) yang telah melestarikan domain dan motif yang memainkan peran spesifik dalam resistensi patogen. RGA dapat dikelompokkan sebagai *nucleotide binding site leucine rich repeat* (NBS-LRR) atau *transmembrane leucine rich repeat* (TM-LRR). Dan RGA yang terkenal adalah situs pengikatan nukleotida yang kaya akan leusin (NLR), reseptor seperti kinase (RLK), dan protein seperti reseptor (RLP). Ribuan RGA telah diidentifikasi dari urutan genom tanaman menggunakan pendekatan bioinformatika (Sekhwal *et al.*, 2015,

Tirnaz *et al.*, 2020). Penelitian Tirnaz *et al.* (2020) berhasil mengidentifikasi sebanyak 34.065 RGA pada *Brassicca* dengan mayoritas adalah RLK (21.691), kemudian NLR (8.588) dan RLP (3.786). Analisis sekuens protein RGA menunjukkan identitas sekuens tingkat tinggi, dimana 99,43% RGA terbagi dalam beberapa ortogrup. Laporan terbaru oleh Cortaga *et al.* (2022), pada genom durian teridentifikasi sebanyak 2586 RGA yang terdiri dari 47 nucleotide binding site protein (NBS), 158 NBS-leucine rich repeat protein (NL), 400 coiled-coil NBS-LRR (CNL), 72 toll/interleukin -1 reseptor NBS-LRR (TNL), 54 kumpulan NBS (CN), 10 reseptor tol/interleukin-1 NBS (TN), 19 reseptor tol/interleukin-1 dengan domain tidak diketahui (TX), 246 protein mirip reseptor (RLP), 1.377 reseptor-like kinase (RLK), 185 TM-CC, dan 18 protein lain yang mengandung NBS dengan domain lain. Selanjutnya, Anuradha *et al.* (2022) menginformasikan bahwa saat ini tersedia database MusaRgene dengan rincian lengkap 3598 gen R yang teridentifikasi dari delapan *Musa* spp. dan kerabatnya. Selain itu, database juga memfasilitasi pemahaman mekanisme pertahanan pisang terhadap tekanan biotik atau abiotik yang mengarah pada pengembangan varietas tahan penyakit yang unggul.

Pemuliaan pisang kepok yang tahan penyakit sampai saat ini masih menemui banyak kendala, baik karena basis genetik yang sempit seperti umumnya pisang, sterilitas, atau ploidy. Dengan dukungan informasi tentang RGA maka pengembangan kultivar yang tahan penyakit bukan lagi suatu keniscayaan. Strategi bioteknologi seperti pemuliaan mutasi untuk memperoleh pisang kepok yang tahan terhadap penyakit darah bakteri dapat menjadi peluang besar dalam pemuliaan pisang resisten di masa depan.

Pemuliaan berbasis mutasi bertujuan untuk mengembangkan dan meningkatkan varietas tanaman dengan memodifikasi satu atau dua sifat utama untuk meningkatkan produktivitas atau kualitasnya. Dan dianggap sebagai pendekatan yang fleksibel dan praktis yang dapat diterapkan pada

tanaman apa pun. Mengingat, mutasi adalah sumber utama dari semua variasi genetik yang ada pada organisme apa pun, termasuk tumbuhan. Pada tanaman yang tidak menghasilkan biji, seperti pisang, induksi mutasi mungkin merupakan satu-satunya cara produktif untuk meningkatkan variabilitas dalam mengembangkan kultivar baru (Oladosu *et al.*, 2016), misalnya kultivar yang memiliki resistensi tinggi terhadap penyakit darah bakteri (BDB).

Pemuliaan mutasi atau sering dikenal dengan mutagenesis terinduksi, umumnya menggunakan tiga jenis mutagenesis, yaitu mutagen terinduksi (sinar gamma, sinar-X, berkas ion, atau perlakuan dengan mutagen kimia); mutagenesis situs terarah, yaitu proses menciptakan mutasi pada lokasi tertentu dalam molekul DNA; dan mutagenesis penyisipan, yang disebabkan oleh penyisipan DNA, baik melalui transformasi genetik dan penyisipan T-DNA atau aktivasi elemen transposable (Kharkwal *and* Shu, 2009; Forster *and* Shu, 2012; Roychowdhury, 2013). Agen mutasi buatan disebut mutagen. Umumnya dikelompokkan dalam dua kategori besar, yaitu mutagen kimia dan mutagen fisik. Pilihan mutagen seyogyanya didasarkan pada keadaan peneliti (seperti keamanan penggunaan, kemudahan penggunaan), ketersediaan mutagen, efektivitas dalam menginduksi perubahan genetik tertentu, jaringan yang sesuai, dan biaya. Efek mutagen kimia pada bahan tanaman umumnya dianggap lebih ringan (Oladosu *et al.*, 2016).

Pemakaian kolkisin sebagai mutagen kimia telah umum digunakan dan telah menghasilkan ribuan tanaman unggul. Senyawa kolkisin memiliki afinitas yang kuat terhadap tubulin, yaitu dapat berikatan dengan tubulin. Kolkisin mempengaruhi pembentukan mikrotubul yaitu dengan cara menghambat polimerisasi mikrotubulin pada fase metafase. Tubulin adalah protein penting pada proses mitosis sehingga ketersediaannya menentukan keberlangsungan proses mitosis. Dengan demikian kolkisin merupakan racun yang efektif untuk proses-proses mitosis, khususnya pembentukan

spindle. Organisasi mikrotubulus yang terganggu akan menyebabkan metafase abnormal sehingga membentuk sel dengan kromosom berlipat. Sedangkan secara tidak langsung kolkisin mempengaruhi struktur membran dengan menghambat sintesis elemen penyusun membran. (Mukhopadhyay *et al.*, 2008; Ade and Rai, 2009).

Ketidakteraturan pembentukan gelendong mitosis dan sitokinesis adalah dua mekanisme pada biogenesis mikrotubulus yang menyebabkan munculnya variasi jumlah kromosom. Mikrotubulus merupakan struktur sel penting dari sitoskeleton dan dibentuk oleh perakitan dimer $\alpha\beta$ -tubulin secara berurutan (Akhmanova and Steinmetz, 2015). Mekanisme penghambatan polimerisasi mikrotubulus oleh kolkisin dan analognya dijelaskan secara detail oleh Sraghsyan *et al.* (2023). Mikrotubulus adalah polimer dinamis dan non-kovalen terdiri dari subunit α - dan β -tubulin yang terlibat secara luas serangkaian proses intraseluler. Polimerisasi dan dinamika mikrotubulus diatur oleh banyak faktor, salah satunya molekul kecil yang berinteraksi dengan situs berbeda pada dimer tubulin. Perakitan mikrotubulus dimulai dengan pembentukan protofilamen, yaitu rantai tubulin $\alpha\beta$ yang terhubung dengan kontak longitudinal. Inhibitor situs pengikatan kolkisin (CBSI) dapat melemahkan hubungan dalam rantai tersebut. Sebagian protofilamen mungkin menjadi "cacat" dan tidak dapat mendukung perakitan mikrotubulus, dan menyebabkan penghambatan polimerisasi, mengganggu kestabilan mikrotubulus atau penghancuran total mikrotubulus dan akhirnya menyebabkan siklus sel terhenti. Pendapat serupa dikemukakan Megbo (2010) bahwa efek perlakuan kolkisin adalah mengganggu pembelahan sel melalui *mitotik spindle perturbation* dengan cara mengaktifkan enzim yang mengganggu organisasi dan fungsi serat spindle.

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian tentang studi resistensi tiga genom pisang kepok oleh kolkisin terhadap *Blood Disease Bacterium* (BDB) dapat menjadi terobosan baru dalam strategi pengembangan kultivar pisang kepok yang tahan terhadap penyakit darah bakteri. Menurut Hutami

dkk. (2006) metode perbanyakan somaklonal melalui kultur jaringan dapat digunakan sebagai strategi pengembangan kultivar pisang kepok tahan penyakit darah bakteri, mengingat metode ini dianggap lebih efektif dan efisien karena perubahan dapat diarahkan pada sifat yang diharapkan.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. memperoleh informasi ilmiah tentang karakter mutagenitas kolkisin pada BDB;
2. mengidentifikasi karakter poliploid kultivar pisang kepok terinduksi kolkisin yang memiliki resistensi tinggi terhadap BDB;
3. memperoleh satu atau lebih genom pisang kepok terinduksi kolkisin yang berpotensi memiliki resistensi terhadap BDB.

1.3. Kerangka Teori

Pemuliaan berbasis mutasi bertujuan untuk mengembangkan dan meningkatkan varietas tanaman dengan memodifikasi satu atau dua sifat utama untuk meningkatkan produktivitas atau kualitasnya. Dan dianggap sebagai pendekatan yang fleksibel dan praktis yang dapat diterapkan pada tanaman apa pun. Mengingat, mutasi adalah sumber utama dari semua variasi genetik yang ada pada organisme, termasuk tumbuhan. Pada tanaman yang tidak menghasilkan biji, seperti pisang, induksi mutasi mungkin merupakan satu-satunya cara produktif untuk meningkatkan variabilitas dalam mengembangkan kultivar baru, misalnya kultivar yang memiliki resistensi tinggi terhadap penyakit darah bakteri (BDB).

Pemakaian kolkisin sebagai mutagen kimia telah umum digunakan dan telah menghasilkan ribuan tanaman unggul. Senyawa kolkisin memiliki afinitas yang kuat terhadap tubulin, yaitu dapat berikatan dengan tubulin. Kolkisin mempengaruhi pembentukan mikrotubul yaitu dengan cara menghambat polimerisasi mikrotubulin pada tahap metafase. Tubulin merupakan protein penting pada proses mitosis sehingga jumlah dan kualitas tubulin menentukan keberlangsungan proses mitosis.

Ketidakteraturan pembentukan gelendong mitosis dan sitokinesis akan menyebabkan munculnya variasi jumlah kromosom. Mikrotubulus merupakan struktur sel penting dari sitoskeleton dan dibentuk oleh perakitan dimer $\alpha\beta$ -tubulin secara berurutan. Mikrotubulus adalah polimer dinamis dan non-kovalen terdiri dari subunit α - dan β -tubulin yang terlibat secara luas serangkaian proses intraseluler. Perakitan mikrotubulus dimulai dengan pembentukan protofilamen, yaitu rantai tubulin $\alpha\beta$ yang terhubung dengan kontak longitudinal. Inhibitor situs pengikatan kolkisin (CBSI) dapat melemahkan hubungan dalam rantai tersebut. Sebagian protofilamen mungkin menjadi "cacat" dan tidak dapat mendukung perakitan mikrotubulus, dan menyebabkan penghambatan polimerisasi, mengganggu kestabilan mikrotubulus atau penghancuran total mikrotubulus dan akhirnya menyebabkan siklus sel terhenti.

Organisasi mikrotubulus yang terganggu akan menyebabkan metafase abnormal sehingga membentuk sel dengan kromosom berlipat (poliploid). Poliploidi pada sel tanaman mengubah sifat agronomisnya. Ukuran sel-sel tanaman poliploid lebih besar dari sel diploid. Volume sel yang lebih besar tersebut menghasilkan jaringan yang lebih tebal, dan ukuran organ tanaman yang lebih besar. Peningkatan dimensi dan area ini mungkin disebabkan oleh fakta bahwa sel-sel dengan komplemen kromosom yang lebih besar tumbuh lebih besar untuk mempertahankan rasio konstan antara sitoplasma terhadap volume inti. Sel poliploid juga mengekspresikan lebih banyak protein oleh kehadiran lebih banyak gen. Dengan demikian, tanaman dengan

sel poliploid memiliki beberapa kelebihan, diantaranya penampakan morfologi tanaman lebih kekar, ukuran stomata dan sel-sel lebih besar, daun lebih lebar, produksinya lebih tinggi, dan lebih tahan serangan patogen dan kekeringan.

Berdasarkan uraian di atas, maka pemuliaan mutasi menggunakan kolkisin untuk menginduksi kultivar pisang kepok yang tahan terhadap *Blood Disease Bacterium* (BDB) dapat menjadi keterbaruan dalam pengembangan kultivar pisang kepok yang tahan terhadap penyakit di masa depan.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi keterbaruan/novelty dalam strategi pengembangan kultivar pisang kepok yang memiliki ketahanan tinggi terhadap penyakit darah bakteri. Kombinasi pemuliaan mutasi dan perbanyakan somaklonal dengan teknik kultur jaringan diharapkan meningkatkan peluang memperoleh pisang kepok dengan sifat – sifat resistensi terhadap penyakit. Selanjutnya dapat dijadikan informasi yang lebih akurat untuk pengembangan dan pemuliaan pisang kepok di masa depan.

1.5. Kebaruan Penelitian (*Novelty*)

Tabel 1. Kebaruan Penelitian

No	Penelitian yang telah dilakukan	Kebaruan Penelitian ini
1	- Mutasi alami (spontan) yaitu pisang “unti sayang” (Suhartanto <i>et al.</i> , 2010; Poerba <i>et al.</i> , 2012)	- penggunaan mutagen kolkisin

	- FAM-PU10 dan Glomus Tipe 1 (Suswati <i>et al.</i>, 2011 dan 2015) - aplikasi antiserum, monospesifik (Baharudin <i>et al.</i>, 1994)	
2	Parameter yang digunakan dalam mengidentifikasi ketahanan penyakit: - Perubahan morfologi - Insidensi penyakit	Parameter yang digunakan dalam mengidentifikasi ketahanan penyakit: - Sitologi - Anatomi - Penanda Molekuler - Biokimia - Insidensi Penyakit

1.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan tujuan penelitian ini maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut:

1. mutagen kolkisin mampu menginduksi pisang kepok poliploid yang resisten terhadap BDB;
2. ada satu atau lebih sifat-sifat yang diamati dapat dijadikan sifat penanda resistensi yang tinggi pada pisang kepok terinduksi kolkisin terhadap BDB;
3. ada satu atau lebih kultivar pisang kepok terinduksi kolkisin memiliki resistensi yang tinggi terhadap BDB.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Pisang Secara Umum

Pusat keanekaragaman pisang diperkirakan di daerah Indo-Malesia dan wilayah Malesia (mencakup Malaysia, Indonesia, Filipina dan Papua Nugini). Dari Asia Tenggara pisang menyebar luas ke negara tropic dan sub-tropik, mulai Asia, Amerika, Afrika sampai Australia (Espino *et al.*, 1997 dalam UNCST, 2007). Valmayor *et al.* (2003) mencatat ada sekitar 149 jenis pisang yang ditemukan di Asia Tenggara. Di Indonesia sendiri, laporan RUSNAS Pengembangan Buah-buahan Unggul Indonesia (2004), mencatat 232 kultivar pisang tersebar di seluruh daerah, sebanyak 115 genotip hasil eksplorasi telah terkoleksi di pusat pengembang plasma nutfah pisang yang ada di beberapa daerah, seperti Bogor, DIY, Semarang, Malang, dan Solok. Di Lampung sendiri Sobir dkk. (2006) menemukan 21 aksesori di Kabupaten Lampung Selatan, dan Ernawati, dkk. (2018) menemukan 27 aksesori pisang di kota Bandar Lampung.

Terminologi pisang yang digunakan pada semua teks mengacu pada semua tipe pisang meliputi pisang olahan dan komersial. Semua pisang, baik itu spesies, varietas, atau hibrida digolongkan dalam genus *Musa*, familia Musaceae, ordo Zingiberales. Genus *Musa* meliputi 30 – 40 spesies yang

kesemuanya liar bergenom diploid ($2n=2x=14,18,20$, atau 22) dan berasal dari Asia Tenggara (Stover *and* Simmonds, 1987). Berdasarkan jumlah kromosom dasar dan orientasi serta susunan bunga majemuk, genus *Musa* dikelompokkan ke dalam 5 golongan. Dua golongan meliputi spesies dengan jumlah kromosom dasar 10 ($2n=10$), yaitu *Callimusa* dan *Australimusa*, dua golongan lainnya meliputi spesies dengan jumlah kromosom dasar 11, yaitu *Eumusa* dan *Rhodochlamys*. Satu golongan terakhir adalah *Incertae sedis* ditujukan untuk spesies dataran tinggi Papua Nugini, yaitu *Musa ingens* Simmonds, dan sekarang mencakup *Musa boman* dan *Musa lasiocarpa* (Daniells *et al.*, 2001).

Spesies yang termasuk *Callimusa* dan *Rhodochlamys* merupakan jenis pisang hias dan tidak menghasilkan biji. Golongan *Australimusa* beranggotakan *M. textilis* Nees (abaca) yang dikenal sebagai rami Manila, dapat berbuah, tidak berbiji sama seperti pisang Fe'i dari Pasifik yang bisa dimakan. Golongan *Eumusa* kadang-kadang disebut *Musa* (pisang sejati) merupakan golongan terbesar dari kelima golongan tersebut dengan 13 – 15 spesies. Pisang komersial dengan jumlah kromosom 22, 33, 44 (kromosom dasar $n=x=11$) berasal sedikitnya dari dua spesies liar, yakni *Musa acuminata* Colla (genom AA) dan *Musa balbisiana* Colla (genom BB), keduanya termasuk dalam golongan *Eumusa* (UNCST, 2007; INIBAP, 2006; Megia, 2005).

2.2. Biologi Pisang Kepok

Seluruh pisang kepok merupakan pisang triploid (Ernawati, dkk., 2018; Hapsari dkk., 2017). Pisang triploid umumnya memiliki penampilan batang semu yang lebih kokoh dan kekar serta buah yang besar dengan daging buah yang cukup kompak, kulit buah tebal dan kasar, warna kulit buah kuning dengan bercak coklat tua, daun yang lebih tebal dan lebar, lebih tahan

terhadap penyakit dan unsur hara yang minim, pertumbuhan vegetatif yang cukup lama ($\pm 1,5$ tahun) dan batang yang cukup tinggi (Hapsari dan Lestari, 2016; Astutik, 2009; Megia, 2005). Pisang kepok merupakan salah satu kultivar dari 232 kultivar pisang yang dimiliki Indonesia. Di Negara lain pisang grup ABB ini dikenal dengan nama sinonim: 'saba' (Filipina), 'kluai hin' (Thailand), 'pisang kepok' (Indonesia), 'pisang abu nipah' (Malaysia) (Duangkongsan *et al.*, 2016). Di Indonesia, pisang kepok memiliki beberapa aksesori dengan nama daerah yang beragam di setiap daerah. Dari penelitian pendahuluan Ernawati dkk., (2018) di kota Bandar Lampung ditemukan 6 aksesori pisang kepok, yaitu kepok batu, kepok kuning, kepok abu, kepok kapas, kepok manado dan kepok australian. Hasil identifikasi kajian tipe genom diperoleh kepok manado, kepok kapas dan kepok kuning termasuk genom BBB (*Musa balbisiana*), kepok batu (genom ABB), kepok abu termasuk genom AAB (*Musa paradisiaca*), sedangkan kepok australian belum dapat ditentukan tipe genomnya. Hasil serupa juga diperoleh Hapsari dkk. (2017), yang melaporkan pisang kepok di Jawa Timur yang dikenal dengan nama gajah, memiliki beberapa aksesori/kultivar yaitu gajah (kepok, bun, ebung), gajah bali (kepok bali, australian, ustrali), gajah merah (kepok merah) dan gajah putih (kepok putih) dengan tipe genom ABB.

Selain keragaman aksesori yang tinggi, pisang kepok memiliki beberapa kelebihan dari aksesori pisang yang lain. Pisang ini tergolong dalam jenis pisang olahan, artinya pisang yang harus diolah terlebih dahulu sebelum dikonsumsi sehingga dapat dimanfaatkan dalam beragam bentuk, baik untuk skala olahan rumah tangga seperti keripik, pisang rebus, pisang goreng, maupun skala industri, seperti tepung pisang. Nilai gizi pisang kepok cukup lengkap dengan kadar air 62,01 %, karbohidrat 35,24 %, protein 1,78 g, lemak 0,05 g, gula total 17,03 g, vitamin C 30,27 mg, potasium 365 mg, dan energi sebesar 148,8 cal (Hapsari and Lestari, 2016; Palupi, 2012; Astutik, 2009).

2.3. Kendala Budidaya Pisang Kepok

Pisang kepok merupakan salah satu kultivar pisang lokal yang memiliki banyak manfaat, selain sebagai bahan pangan juga hampir seluruh bagian tanaman memiliki kegunaan sehingga sangat prospektif untuk dikembangkan. Hasil kajian usahatani pisang kepok di Kabupaten Kutai Timur, Kalimantan Timur (Rizal dan Triwidyawati, 2015) menunjukkan nilai R/C sebesar 2,82 sehingga dapat digolongkan sebagai usaha yang layak untuk dikembangkan. Usaha penanaman pisang kepok melibatkan masyarakat luas dan menyebar di hampir seluruh wilayah Indonesia. Keberhasilan usahatani pisang ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu penerapan teknologi budidaya, penggunaan varietas unggul, perbaikan varietas yang tahan terhadap hama dan penyakit, produksi tinggi serta kualitas buah yang bagus dan disukai masyarakat luas (Rizal dan Triwidyawati, 2015). Laporan yang sama diperoleh dari hasil penelitian Suhartanto dkk. (2010) yang menunjukkan bahwa dalam pengembangan tanaman pisang kepok melalui penerapan Good Agricultural Practice (GAP) pada tingkat petani diperoleh hasil pertumbuhan tanaman lebih baik dengan perlakuan SOP dibandingkan tanpa SOP.

Meskipun tanaman pisang dikenal dan dibudidayakan sejak lama tetapi pengetahuan genetik genom pisang masih terbatas (Mancho-Sanchez *et al.*, 2015). Keterbatasan pengetahuan tentang genom pisang berdampak pada banyak aspek pemuliaan dan seleksi yang mungkin dilakukan pada tanaman lain tidak dapat diterapkan pada pisang. Sifat partenokarpi, sterilitas, dan ploidi adalah beberapa kendala pada pemuliaan dan seleksi pisang (Mancho-Sanchez *et al.*, 2015). Masalah tersebut tidak terkecuali terjadi pada pisang kepok.

Secara umum produktivitas pisang kepok yang dikembangkan masyarakat masih sangat rendah. Rendahnya produktivitas tersebut disebabkan beberapa hal antara lain: teknik budidaya yang tidak tepat dan gangguan hama serta

penyakit yang tinggi. Sebagaimana dikatakan Bloome *et al.* (2017), produktivitas rendah dan kehilangan hasil panen pisang disebabkan masih adanya kendala utama yaitu independensi kawasan, sistem produksi, serta hama dan penyakit. Ada dua penyakit berbahaya dan mematikan pada pisang, yaitu layu bakteri dan layu fusarium. Beberapa peneliti menyebutkan penyakit layu bakteri pada tanaman pisang di Indonesia sebagai penyakit darah bakteri (*Blood Diseases Bacterium* /BDB) (Edden-Green, 1994). Selain itu, pertumbuhan vegetatif pisang kepok yang cukup lama ($\pm 1,5$ tahun), dan batang cukup tinggi yang menyulitkan dalam karakterisasi juga menjadi kendala (Astutik, 2009). Oleh karena itu perlu strategi bioteknologi seperti pemuliaan mutasi untuk mengatasi kendala pengembangan kultivar pisang kepok unggul pada sifat tertentu, sehingga budidaya pisang kepok dapat mencapai hasil yang optimal.

2.4. Biologi Penyakit Darah Bakteri (*Blood Diseases Bacterium*/BDB)

Penyakit darah bakteri (BDB) merupakan penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri yang menyerang jaringan vaskular pisang. Nama tersebut diadopsi karena tetesan cairan putih susu, kuning atau merah- coklat kental yang sering keluar dari jaringan vaskular tanaman yang terinfeksi yang terlihat pada permukaan batang tanaman yang terpotong. Penyakit ini menjangkit kultivar kelompok genom AAA dan ABB (Davis *and* Liberato, 2006). Cairan putih kecoklatmerahan muncul dari permukaan batang semu yang dilukai dan buah yang terinfeksi (Kusumoto *et al.*, 2004). Pendapat serupa mengatakan bahwa jika jaringan vaskular tanaman yang sehat dipotong maka akan memancarkan tetesan cairan warna putih sedangkan jaringan vaskuler yang terinfeksi bakteri darah akan berubah menjadi merah kecoklatan atau hitam. Perubahan warna jaringan vaskular tersebut dapat ditelusuri dari tangkai turun ke tandan buah (Eden-Green, 1994).

Kejadian (insidensi) serangan penyakit darah pisang pertama kali dilaporkan di Pulau Selayar, Sulawesi Selatan sekitar 80 tahun silam yang mengakibatkan perkebunan pisang di daerah tersebut ditutup dan ditinggalkan. Penerapan karantina yang ketat oleh otoritas Belanda saat itu dengan membatasi pergerakan buah pisang dan tumbuh-tumbuhan asal Sulawesi dapat mencegah penyebaran penyakit ini sampai tahun 1987 dimana wabah ini ditemukan di Jawa Barat (Edden-Green, 1994). Penyakit ini hanya menyerang tanaman pisang (Jaffar *et al.*, 2016). Intensitas serangan tertinggi BDB tercatat terjadi di Lampung setelah Sumatera Barat dan Jawa Barat, yakni mencakup sekitar 1800 hektar (Sahlan dan Nurhadi, 1994). Peningkatan areal serangan yang berhasil dilaporkan Cahyaniati dkk. (1997) adalah pada kurun waktu bulan Mei – Juni 1993 di Lampung Selatan dari 13,18 ha menjadi 963,38 ha. Penyakit ini terdeteksi juga di 90 % propinsi di Indonesia dan menyebabkan produksi pisang selama lima tahun berturut-turut mengalami penurunan (Hadiwiyono, 2011). Di Lumajang, Addy dkk. (2016) melaporkan bahwa penyakit BDB merupakan penyakit penting dan menyebabkan hilangnya hasil panen yang parah. Ploetz *et al.* (2015) mengaitkan penyebaran wabah ini dengan program transmigrasi di Indonesia dimana orang-orang dari Jawa dipindahkan ke daerah (Pulau) berpenduduk lebih sedikit. Riastiwi (2017) menginventarisasi penyakit-penyakit pisang yang menyerang 560 individu koleksi kebun plasma nutfah Cibinong Science Centre –BG dan didapatkan 4 penyakit yaitu, layu fusarium, bercak *cordana*, *black sigatoka* dan *yellow sigatoka*. Meskipun dari hasil tersebut tidak ditemukan penyakit darah bakteri, namun tidak berarti penyakit darah bakteri sudah musnah mengingat bakteri penyebab penyakit darah bakteri mampu bertahan selama 1 – 2 tahun di dalam tanah yang terinfeksi (Hadiwiyono, 2011; Suswati dkk., 2011; Jaffar dkk., 2016) sehingga masih berpotensi untuk muncul kembali sangat besar.

Penyebaran BDB sangat dipengaruhi oleh ketinggian tempat dan jenis tanah. Serangan BDB dominan di dataran rendah 900 m dpl dibandingkan

dataran tinggi (Hadiwiyono, 2010). Selain itu, iklim makro di sekitar pertanaman pisang akibat kanopi pisang kepok yang lebih lebar dari jenis pisang lainnya diduga mempengaruhi perkembangan populasi serangga dan patogen (Burhanudin dkk., 1994). Rata-rata serangan penyakit pisang pada 3 strata penggunaan lahan sebagai berikut: sawah 5,41 %, tegalan 3,81 % dan pekarangan 7,10 % (Suharjo dkk., 2008). Pisang kepok ternyata lebih banyak terserang daripada pisang raja dengan tingkat serangan penyakit sebesar 40,04 % (Leiwakabessy, 2003). Sedangkan Hadiwiyono (2010) mendapatkan serangan BDB pada pisang kepok 86,78 % dibanding pada pisang raja bandung 78,46 %. Sedangkan rata-rata serangan BDB di 3 kecamatan sentra produksi pisang kepok Kabupaten Minahasa Utara adalah sebesar 6,75 % (Redsway, 2014).

Kerusakan yang ditimbulkan oleh penyakit darah bakteri bersifat mutlak, bila tanaman diserang pada fase vegetatif tanaman akan mati, dan jika serangan terjadi pada fase generatif (terinfeksi lewat bunga) jika tanaman mampu memproduksi buah tidak akan laku terjual karena daging buah berlendir dan berwarna merah kecoklatan atau hitam (Redsway, 2014). Akar tanaman yang terinfeksi terhambat perkembangannya (Teng *et al.*, 201x). Serangan pada organ daun dapat dilihat dari beberapa ciri. Pada daun muda gejala serangan lebih menonjol dibanding daun yang lebih tua (Teng *et al.*, 201x). Pada tanaman yang lebih tua, gejala yang paling sering terdeteksi adalah daun-daun layu dan menguning serta munculnya garis-garis coklat gelap yang menunjukkan adanya kumpulan pembuluh darah bawah epidermis yang terinfeksi. Kerusakan pada pangkal petiola akibat serangan BDB menyebabkan ambruk dan daun layu menggantung di sekitar pseudostem. Daun termuda terhenti pertumbuhannya, tidak muncul dan bakal daun mengembang keputihan yang selanjutnya muncul nekrotik di lamina (Suhaimi dkk., 2017; Eden-Green, 1994). Kemudian Jaffar dkk. (2016) membuktikan bahwa layu yang diawali pada pucuk menyebabkan daun-daun muda akan terlihat kekuningan dan pucat, menggulung, nekrotik, mengering kemudian akan layu dan akhirnya mati. Pelepah dan tangkai

daun terluar kehilangan turgiditasnya sehingga terkulai dan membusuk. Daun muda yang muncul dari batang semu menjadi kuning dan nekrotik kemudian mengerut (Kusumoto *et al.*, 2004). Daun yang kehilangan turgiditasnya meskipun warnanya masih hijau akan tampak keriput dan sedikit meringkuk (Teng *et al.*, 201x). Hadiwiyono (2011) menjelaskan penampakan vegetatif tanaman pisang kepok kuning yang terserang BDB memiliki daun yang terkulai.



A



B

Gambar 1. Kerusakan tanaman pisang akibat serangan BDB

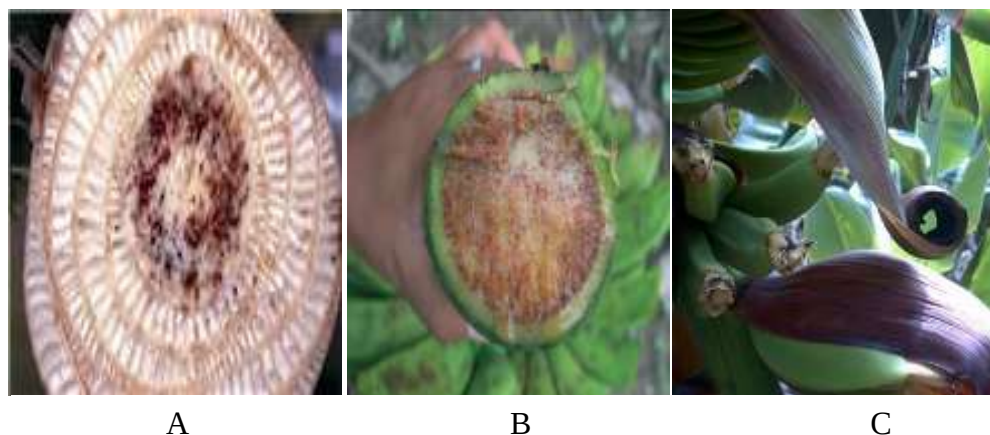
Keterangan: A : Daun yang terkulai dan menguning

B : Daun kering dan tanaman mati

(Sumber: <http://www.planthealthaustralia.com.au/wpcontent/uploads/2013/01/Blooddisease-FS.pdf>)

Bunga pisang atau sering disebut dengan jantung merupakan salah satu organ tempat penetrasi bakteri penyebab penyakit BDB. Jantung pisang kepok lebih banyak dikunjungi serangga karena mempunyai kandungan senyawa tertentu yang bersifat atraktan yang menarik bagi serangga pengunjung (Burhanudin dkk., 1994; Leiwakabessy, 2003). Gejala kerusakan pada pisang kepok kuning adalah jantung pisang mengering mulai dari bagian pangkal jantung. Demikian juga pada pisang kepok abu jantung pisang tampak mengering (Hadiwiyono, 2011). Bunga jantan mengerut dan menghitam (Eden-Green, 1994). Pada buah gejala kerusakan yang muncul dapat berupa buah kadang-kadang pecah dan menghitam, sistem vaskular dalam buah menjadi coklat kemerahan

(Kusumoto *et al.*, 2004). Penelitian Devi dkk. (2013) membuktikan bahwa buah pisang yang diinfeksi inokulum bakteri penyebab BDB menunjukkan gejala serangan BDB setelah 7 hari inokulasi. Ditandai dengan munculnya bercak kemerahan pada daging buah dan plasenta buah pisang berubah menjadi kecoklatan. Buah mengering, terdapat warna coklat dan bintik merah pada buah bila buah diiris vertikal dan horizontal. Sedangkan di sepanjang batang terlihat garis coklat dan merah yang seragam (Addy dkk., 2016).



Gambar 2. Kerusakan jaringan vaskular dan buah pisang akibat serangan BDB

Keterangan: A : Jaringan vaskuler pada batang
B : Jaringan vaskuler pada tandan buah
C : Buah pisang

(Sumber: <http://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/01/Blood-disease-FS.pdf>)

Vektor penyakit BDB didominasi serangga dari ordo Diptera (Leiwakabessy, 2003). Serangga *Erionata thrax* berpotensi besar sebagai vektor penyebar patogen penyakit BDB. Pada serangga tersebut, bakteri patogen BDB ditemukan pada bagian kaki, sayap, permukaan kepala, bagian dalam kepala dan di permukaan tubuh serangga, sedangkan pada imago dan larvanya tidak dijumpai bakteri patogen (Suharjo dkk., 2006). Penelitian lain mendapatkan hasil bahwa populasi *Trigona minangkabau* dalam jumlah yang tinggi pada bunga pisang sehat dan sakit, sehingga

serangga ini diduga berpotensi besar sebagai penyebar *R. Solanacearum* Phylotype IV (Mairawati dkk., 2012 a). Hasil penelitian Mairawati dkk. (2012 b) berikutnya membuktikan bahwa kemelimpahan serangga pengunjung bunga pisang kepok lebih tinggi dibandingkan pada pisang lainnya. Selanjutnya dijelaskan bahwa jenis dan jumlah serangga pengunjung bunga tertinggi ditemukan pada saat bunga jantan dan betina mekar, sehingga waktu tersebut merupakan kondisi kritis bagi tanaman pisang terserang penyakit.

Pengendalian penyakit ini dapat dilakukan baik secara teknis, kimiawi, dan biologi. Penghilangan kuncup bunga jantan, pemilihan bahan tanaman yang sehat merupakan upaya pengendalian secara teknis (Eden-Green, 1994). Pengendalian secara kimiawi dilakukan melalui desinfektan alat pertanian seperti: cangkul dan pemotong buah, sanitasi lapangan/areal (Eden-Green, 1994), dan aplikasi acibendazolar-S-Methyl pada tahap pembibitan dan dewasa (Supriadi, 2011). Meskipun demikian pengendalian patogen secara kimiawi tersebut masih diteliti lebih lanjut mengingat belum ada obat kimiawi yang efektif untuk penyakit BDB (Teng *et al.*, 201x). Pengendalian secara biologi dapat dilakukan dengan aplikasi ekstrak buah mengkudu (Efri dan Aeny, 2004), aplikasi bakteri antagonis (Aeny dkk., 2007), aplikasi FMA indigenus PU10 – *Glomus sp 1* (Suswati dkk., 2011), aplikasi inokulum *Glomus* Tipe 1 pada perakaran bibit pisang kepok (Suswati dkk., 2015), aplikasi isolat *Bacillus sp.* (Hadiwiyono dan Widiono, 2013), aplikasi bakteri endofit (Marwan, 2014). Penggunaan dua bakteri pembentuk biofilm yang diisolasi dari tanaman pisang yang terinfeksi mampu mengurangi perkembangan dan infeksi penyakit darah parah yang disebabkan oleh agen patogen, *R. syzygii* subsp. *celebesensis*. Data SEM ternyata menunjukkan bahwa *E.cloacae* dan *E. hormaechei* menghambat mekanisme adhesi dan kolonisasi patogen dalam inang (Suhaimi dkk., 2017).

2.5. *Resistance Gene Analogues (RGAs)*

Tumbuhan telah mengembangkan sistem pertahanan yang kompleks terhadap beragam hama dan patogen. Reseptor tanaman memulai jalur sinyal yang mendorong ekspresi gen respons pertahanan. Sistem kekebalan tanaman mengandalkan kemampuannya untuk mengenali molekul musuh, melakukan transduksi sinyal, dan merespons secara defensif melalui jalur yang melibatkan banyak gen dan produknya. Sedangkan patogen secara aktif berusaha menghindari dan mengganggu jalur respons, memilih sistem kekebalan multikomponen yang terdesentralisasi. Desentralisasi sistem kekebalan tanaman membuka peluang evolusioner peningkatan untuk resistensi patogen, serta mekanisme tambahan untuk penghambatan patogen terhadap respons pertahanan tersebut (Andersen *et al.*, 2018).

Pada awal abad ke-20, pengetahuan tentang heritabilitas dan genetika memungkinkan para peneliti untuk mengidentifikasi sumber resistensi yang diwariskan, yang disebut gen resistensi (gen R). Ketahanan tanaman bergantung pada sistem pengaturan kompleks yang mengontrol respons pertahanan tanaman, yang sangat bergantung pada struktur sederhana model gen-untuk-gen HH Flor (gen R). Komponen sistem kekebalan tanaman berperan dalam deteksi patogen, transduksi sinyal, atau respons pertahanan (Andersen *et al.*, 2018).

Dari beberapa sumber Backiyarani *et al.* (2013) mencatat bahwa gen ketahanan hama dan penyakit (gen R) terdiri dari sekelompok besar dan beragam pada genom tanaman. Berdasarkan fitur molekuler umum, gen R secara garis besar dapat dibagi menjadi setidaknya lima kelas struktural. Salah satunya Gen dari kelas NBS - LRR yang tahan terhadap patogen bakteri, jamur dan virus, hama kutu daun dan nematode. Selain NBS-LRR dan gen R lainnya disusun dalam kelompok besar dan luas dalam genom. Namun, Backiyarani *et al.* (2013)

juga mencatat bahwa gen NBS-LRR dan *Resistance Gene Analogues* (RGAs) merupakan penanda resistensi yang berbeda.

Analog gen ketahanan tanaman (RGA), termasuk kandidat gen resistensi (R) yang telah melestarikan domain dan motif yang memainkan peran spesifik dalam resistensi patogen. RGA dapat dikelompokkan sebagai *nucleotide binding site leucine rich repeat* (NBS-LRR) atau *transmembrane leucine rich repeat* (TM-LRR). Dan RGA yang terkenal adalah situs pengikatan nukleotida yang kaya akan leusin (NLR), reseptor seperti kinase (RLK), dan protein seperti reseptor (RLP). Ribuan RGA telah diidentifikasi dari urutan genom tanaman menggunakan pendekatan bioinformatika (Sekhwal *et al.*, 2015, Tirnaz *et al.*, 2020). Penelitian Tirnaz *et al.* (2020) berhasil mengidentifikasi sebanyak 34.065 RGA pada *Brassicca* dengan mayoritas adalah RLK (21.691), kemudian NLR (8.588) dan RLP (3.786). Analisis sekuens protein RGA menunjukkan identitas sekuens tingkat tinggi, dimana 99,43% RGA terbagi dalam beberapa ortogrup. Laporan terbaru oleh Cortaga *et al.* (2022), pada genom durian teridentifikasi sebanyak 2586 RGA yang terdiri dari 47 nucleotide binding site protein (NBS), 158 NBS-leucine rich repeat protein (NL), 400 coiled-coil NBS-LRR (CNL), 72 toll/interleukin -1 reseptor NBS-LRR (TNL), 54 kumparan NBS (CN), 10 reseptor tol/interleukin-1 NBS (TN), 19 reseptor tol/interleukin-1 dengan domain tidak diketahui (TX), 246 protein mirip reseptor (RLP), 1.377 reseptor-like kinase (RLK) 185 TM-CC, dan 18 protein lain yang mengandung NBS dengan domain lain. Selanjutnya, Anuradha *et al.* (2022) menginformasikan bahwa saat ini tersedia database MusaRgene dengan rincian lengkap 3598 gen R yang teridentifikasi dari delapan *Musa* spp. dan kerabatnya. Selain itu, database juga memfasilitasi pemahaman mekanisme pertahanan pisang terhadap tekanan biotik atau abiotik yang mengarah pada pengembangan varietas tahan penyakit yang unggul.

Pemuliaan pisang kepok yang tahan penyakit sampai saat ini masih menemui banyak kendala, baik karena basis genetik yang sempit seperti umumnya pisang, sterilitas, atau ploidy. Dengan dukungan informasi tentang RGA maka pengembangan kultivar yang tahan penyakit bukan lagi suatu keniscayaan. Strategi bioteknologi seperti pemuliaan mutasi untuk memperoleh pisang kepok yang tahan terhadap penyakit darah bakteri dapat menjadi peluang besar dalam pemuliaan pisang resisten di masa depan.

2.6. Pengembangan Kultivar Pisang Kepok Tahan Penyakit Darah Bakteri

Ketahanan pisang kepok terhadap penyakit darah bakteri dapat diperoleh melalui mutasi spontan atau alami seperti yang terjadi di Sulawesi Selatan yang kemudian dilepas sebagai varietas unggul dengan nama pisang “unti sayang” dan pisang “Amorang” di daerah Maluku dan Papua. Pisang ini secara alami tidak memiliki bunga jantan (jantung) sehingga tahan (*escape*) terhadap penyakit darah bakteri (Suhartanto dkk., 2010; Poerba dkk., 2012). Namun fakta di lapangan menunjukkan bahwa mutasi alami yang terjadi pada pisang unti sayang ternyata dapat mengalami mutasi balik (*recovery*) karena adanya gen pemulih (*recovery gene*) sehingga pisang mempunyai bunga jantan kembali (Naipopos dkk., 2014). Dengan demikian, pisang unti sayang sangat dimungkinkan kembali rentan terhadap penyakit darah bakteri. Oleh karena itu perlu strategi bioteknologi seperti pemuliaan mutasi untuk mengatasi kendala pengembangan kultivar pisang kepok unggul pada sifat tertentu. Sebagaimana dikatakan Supriadi (2011) bahwa varietas unggul dapat diperoleh melalui perluasan keragaman gen ketahanan baik melalui eksplorasi, pemanfaatan teknologi mutasi dan fusi protoplasma.

2.6.1. Pemuliaan Mutasi

Di alam, mutasi terjadi pada tingkat sangat lambat sehingga menghambat upaya memperbaiki tanaman. Kemajuan ilmu pengetahuan dan bioteknologi telah membuka jalur baru dalam pendekatan pemuliaan mutasi. Pendekatan-pendekatan tersebut telah memberikan hasil yang lebih efektif, efisien, dan cepat. Pemuliaan mutasi merupakan salah satu teknik yang memungkinkan untuk mengembangkan varietas tanaman baru dengan karakteristik yang lebih baik seperti ketahanan iklim, hasil, waktu pematangan, dan ketahanan terhadap hama dan penyakit. Karakter yang muncul tersebut tidak berasal dari segregasi atau rekombinan genetik. Dengan demikian, mutagenesis terinduksi memiliki nilai penting yang tinggi, karena tidak hanya memberikan kemungkinan menghasilkan mutasi untuk setiap gen yang diinginkan, namun memungkinkan pengembangan beberapa mutasi untuk setiap gen target yang diduga memiliki potensi tertentu (Sebatian *et al.*, 2023 ; Udage, 2021 ; Shu *et al.*, 2012).

Pemuliaan berbasis mutasi dapat mengembangkan dan meningkatkan varietas tanaman dengan memodifikasi satu atau dua sifat utama untuk meningkatkan produktivitas atau kualitasnya. Dan dianggap sebagai pendekatan yang fleksibel dan praktis yang dapat diterapkan pada tanaman apapun. Mengingat, mutasi adalah sumber utama dari semua variasi genetik yang ada pada organisme apapun, termasuk tumbuhan. Pada tanaman yang tidak menghasilkan biji, seperti pisang, induksi mutasi mungkin merupakan satu-satunya cara produktif untuk meningkatkan variabilitas dalam mengembangkan kultivar baru (Oladosu *et al.*, 2016), misalnya kultivar yang memiliki resistensi tinggi terhadap penyakit darah bakteri (BDB).

2.6.2. Agen Mutasi (Mutagen)

Sebagian besar pendekatan pemuliaan mutasi bergantung pada agen mutasi yang bertanggung jawab atas terciptanya mutasi dari materi genetik tanaman. Agen mutagenik yang digunakan menjadi bagian integral dari pemuliaan mutasi tanaman karena menghasilkan mutasi dengan kecepatan jauh lebih tinggi dibandingkan mutasi spontan. Mutagenesis secara sederhana didefinisikan sebagai pembentukan mutasi genetik yang dapat menginduksi variasi genetik secara acak pada tanaman. Mutan merupakan hasil mutagenesis. Mutan adalah individu dengan mutasi tunggal atau mutasi ganda pada genomnya, dan dapat diidentifikasi melalui cara molekuler atau fenotip. Metode mutagenesis fisik dan kimia umumnya digunakan dalam program pemuliaan mutasi. (Sebatian *et al.*, 2023; Udage, 2021; Shu *et al.*, 2012).

Agen mutasi buatan disebut mutagen. Umumnya dikelompokkan dalam dua kategori besar, yaitu mutagen kimia dan mutagen fisik. Pilihan mutagen seyogyanya didasarkan pada keadaan peneliti (seperti keamanan penggunaan, kemudahan penggunaan), ketersediaan mutagen, efektivitas dalam menginduksi perubahan genetik tertentu, jaringan yang sesuai, biaya dan ketersediaan. Efek mutagen kimia pada bahan tanaman umumnya dianggap lebih ringan (Oladosu *et al.*, 2016).

Dari beberapa sumber Oladosu *et al.* (2016) memberi pemahaman secara detail bahwa pemilihan mutagen yang tepat sangat penting dalam pemuliaan mutasi karena mutagen yang berbeda memiliki sifat mutagenik yang berbeda. Mutagen fisik lebih menguntungkan dibandingkan mutagen kimia karena mutagen fisik tidak perlu

perlakuan yang khusus setelah digunakan, dan mutagen fisik tidak menghasilkan limbah. Mutagen kimia sangat mampu menginduksi mutasi gen. Namun, mutagen kimia mempunyai masalah utama dalam pembentukan residu. Residu bahan kimia ini dapat bersifat karsinogenik dan menyebabkan gangguan kesehatan pada manusia. Oleh karena itu, meskipun mutagen kimia menjanjikan hasil yang tinggi, para peneliti tetap mencari alternatif seperti mutagen fisik dan biologis karena mutagen tersebut tidak menimbulkan residu apa pun setelahnya. perlakuan.

Penelitian yang dilakukan terhadap mutagen biologis yang berasal dari tumbuhan saat ini masih pada tingkat yang minim. Namun, dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, penelitian baru tentang mutagen biologis akan terus maju. Pendekatan bioteknologi baru dan teknik biologi molekuler seperti teknologi transposon akan membantu pengembangan mutagen biologis. Agen mutagenik biologis memiliki potensi besar untuk mutagenesis (Sebastian *et al.*, 2023).

2.6.3. Kolkisin

Kolkisin sebagai mutagen kimia telah umum digunakan dan telah menghasilkan ribuan tanaman unggul. Senyawa kolkisin memiliki afinitas yang kuat terhadap tubulin, yaitu dapat berikatan dengan tubulin.. Kolkisin mempengaruhi pembentukan mikrotubul yaitu dengan cara menghambat polimerisasi mikrotubulin pada fase metafase. Tubulin adalah protein penting pada proses mitosis sehingga ketersediaanya menentukan keberlangsungan proses mitosis. Dengan demikian kolkisin merupakan racun yang efektif untuk proses-proses mitosis, khususnya pembentukan spindle. Organisasi mikrotubulus yang terganggu akan menyebabkan metafase abnormal sehingga membentuk sel dengan kromosom

berlipat. Sedangkan secara tidak langsung kolkisin mempengaruhi struktur membran dengan menghambat sintesis elemen penyusun membran. (Mukhopadhyay *et al.*, 2008; Ade and Rai, 2009).

Ketidakteraturan pembentukan gelendong mitosis dan sitokinesis adalah dua mekanisme pada biogenesis mikrotubulus yang menyebabkan munculnya variasi jumlah kromosom. Mikrotubulus merupakan struktur sel penting dari sitoskeleton dan dibentuk oleh perakitan dimer $\alpha\beta$ -tubulin secara berurutan (Akhmanova and Steinmetz, 2015). Mekanisme penghambatan polimerisasi mikrotubulus oleh kolkisin dan analognya dijelaskan secara detail oleh Sraghsyan *et al.* (2023). Mikrotubulus adalah polimer dinamis dan non-kovalen terdiri dari subunit α - dan β -tubulin yang terlibat secara luas serangkaian proses intraseluler. Polimerisasi dan dinamika mikrotubulus diatur oleh banyak faktor, salah satunya molekul kecil yang berinteraksi dengan situs berbeda pada dimer tubulin. Perakitan mikrotubulus dimulai dengan pembentukan protofilamen, yaitu rantai tubulin $\alpha\beta$ yang terhubung dengan kontak longitudinal. Inhibitor situs pengikatan kolkisin (CBSI) dapat melemahkan hubungan dalam rantai tersebut. Sebagian protofilamen mungkin menjadi "cacat" dan tidak dapat mendukung perakitan mikrotubulus, dan menyebabkan penghambatan polimerisasi, mengganggu kestabilan mikrotubulus atau penghancuran total mikrotubulus dan akhirnya menyebabkan siklus sel terhenti. Pendapat serupa dikemukakan Megbo (2010) bahwa efek perlakuan kolkisin adalah mengganggu pembelahan sel melalui mitotik spindle perturbation dengan cara mengaktifkan enzim yang mengganggu organisasi dan fungsi serat spindle.

Kolkisin sering digunakan untuk menginduksi mutasi yang menghasilkan tanaman poliploid. Perlakuan kolkisin pada tanaman menginduksi metafase abnormal sehingga terbentuk sel tanaman

dengan jumlah kromosom berlipat. Poliploid pada sel tanaman mengubah sifat agronomis tanaman (Nautiyal, 2011; Alemu *and* Daba, 2016). Tanaman mutan (poliploid) mempunyai sifat-sifat yang unggul dan lebih baik dari tanaman normal (diploid), antara lain sel-selnya lebih besar, daun lebih lebar, tanaman lebih besar, lebih tahan terhadap pengaruh lingkungan, lebih tahan penyakit, dan produksinya lebih tinggi. Namun demikian beberapa kekurangannya juga dapat ditemukan, misalnya tekanan osmotik sel berkurang, pembelahan sel terhambat, dan masa vegetatif lebih panjang. Sifat-sifat anatomi sering juga digunakan untuk membandingkan takson (tingkat ploidi) yang berbeda. Selain itu, anatomi daun juga memiliki fungsi sebagai organ untuk fotosintesis dan transpirasi. Kedua fungsi tersebut ditentukan oleh kandungan klorofil, terutama klorofil a dan b. Demikian juga pembukaan mulut stomata dan jumlah per luas daun yang lebih besar akan meningkatkan laju fotosintesis. Dengan demikian indeks stomata dapat dijadikan salah satu karakter dalam menyeleksi tanaman dengan produksi yang tinggi (Kertasapoetra, 1988; Crowder, 1997, Soedjono, 2003). Masalah khusus induksi ploidy akibat kolkisin, terutama pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif adalah khimerism yang disebabkan adanya jaringan dengan tingkat ploidi yang berbeda di satu tanaman atau bagian tanaman (Ade *and* Rai, 2009; Bharati *et al.*, 2006).

Penetrasi dan distribusi agen mutagenik yang tidak seragam dapat menyebabkan berkembangnya khimera. Ada tiga jenis khimera, yaitu khimera meriklinal, periklinal dan sektoral. Pada khimera meriklinal, mutasi terjadi pada satu lapisan di sepanjang suatu sisi maka produk pembelahan sel dari sel-sel yang bermutasi tersebut terjadi hanya pada satu sisi tanaman dan khimera meriklinal tidak stabil. Khimera periklinal, mutasi terjadi pada satu

(atau lebih) lapisan sehingga produk pembelahan sel dari sel yang bermutasi menyebar dan menutupi seluruh lapisan. Hasilnya stabil hingga sangat stabil. Khimera sektoral, mutasi terjadi pada banyak lapisan sehingga produk pembelahan sel dari sel yang bermutasi menimbulkan sebagian sel atau seluruh bagian tumbuhan bermutasi. Perubahan yang terlihat pada mutan yang diinduksi meliputi luas daun (parameter biometrik), fotosintesis, hormon (parameter fisiologis) prolin, protein, metabolit sekunder dan enzim antioksidan (parameter biokimia) terlihat pada mutan yang diinduksi (Sebastian *et al.*, 2023).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dirancang dalam dua tahap. Tahap pertama telah dilakukan pada tahun 2017 dan 2018 untuk mendapatkan informasi keragaman genetik tanaman pisang baik secara morfologi (telah dipublikasikan) maupun molekuler (proses publikasi). Berdasarkan penelitian tahap ini ditentukan 3 kultivar pisang kepok yang menjadi pilihan sebagai bahan tanaman untuk penelitian utama.

Penelitian tahap kedua (utama) dilaksanakan mulai bulan Februari sampai dengan bulan Desember 2019. Kegiatan penelitian meliputi pembuatan ekstrak umbi kembang sungsang, analisis kandungan fenol, enzim peroksidase, analisis sitologi dan anatomi dilakukan di Laboratorium Botani FMIPA; kultur jaringan tanaman pisang kepok dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan PT GGPC Lampung Timur. Aklimatisasi planlet dan pengamatan ketahanan terhadap penyakit BDB di rumah kaca pribadi, dan analisis penanda molekuler dilakukan di LTSIT Universitas Lampung.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan Tanaman yang digunakan adalah 3 kultivar pisang kepok berbeda tipe genom dari hasil penelitian tahap 1 (Ernawati dan Nurhasanah, 2018), yaitu kepok abu (genom AAB), kepok batu (genom ABB) dan kepok kuning

(genom BBB). Bahan–bahan lain yang dibutuhkan antara lain media tanam pisang kepok terdiri dari campuran tanah, pupuk kandang dan arang sekam dengan perbandingan 3:1:1. Inokulum bakteri BDB diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.

Bahan Kimia terdiri dari kemikalia untuk kultur jaringan meliputi media dasar MS, NAA, IAA, BA, HCl, KOH, alkohol, spiritus, Dithane-M45, bakterisida Agrept, Bayclin dan Tween 80. Kemikalia untuk penanaman dan perawatan tanaman di rumah kaca: NPK dan pupuk kandang. Kemikalia untuk preparasi mitosis: asam asetat glasial, hidrokuiolin, HCl, *aceto-orsein*, alkohol, minyak imersi, kutek. Kemikalia untuk preparasi anatomi daun: safranin, alkohol, dan kutek. Kemikalia untuk analisis fenolik: etil asetat, Reagen *Folin Calceur*, dan Na_2CO_3 . Kemikalia untuk analisis enzim peroksidase: dapar kalium fosfat, dan *Polyvinylpolypyrrolidone* (PVP). Sedangkan kemikalia untuk analisis penanda molekuler: seri primer, RNase, lysate, buffer, AP1, MgCl_2 , alkohol, dan etanol.

Alat-alat yang digunakan meliputi botol kultur, cawan petri, gelas ukur, gelas erlenmeyer, gelas objek, gelas penutup, pipet, pipet ukur, pinset, mikropipet, pisau, gunting, silet, lampu bunsen, korek api, sekop tanaman, aluminium foil, kertas saring (*Whatman filter paper*), kain kasa, kertas merang, polybag, kantong plastik, nampan, boks plastik, *autoclave*, *laminar air flow*, *spektrofotometer UV*, timbangan digital, *hot plate*, pH-meter, oven, *magnetic stirrer*, *Dneasy Plant Mini Kit* (50) (Qiagen, Cat#69104), *Qiacube*, *Nanophotometer* (P 360), *Pyromark PCR Kit*, *QIAxcel DNA High Resolution Kit*, *Pyromark Q24*, mortar, tabung berbagai ukuran, vortex, *heating block* suhu 65°C , *microcentrifuge*, *life taouch* 1.7 ml *microcentrifuge tube*, mikropipet berbagai ukuran, *Bioclean Aerosol Resistant Barrier Tip*, *shaker*, *disposable free powder gloves*, alat tulis dan kamera digital.

3.3. Rancangan Percobaan

3.3.1. Rancangan Perlakuan

Penelitian utama dilakukan di dua tempat, yaitu Laboratorium kultur jaringan dan rumah kaca. Penelitian di rumah kaca akan disusun secara faktorial dalam Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 5 ulangan dan ulangan sebagai kelompok. Faktor 1 terdiri dari 2 level, yaitu tanpa diberi penambahan (0% = A1), kolkisin 0,1 % (A2). Faktor 2 adalah 3 kultivar pisang, yaitu kepok abu (KA), kepok batu (KB) dan kepok kuning (KK). Semua kombinasi perlakuan diulang 5 kali sehingga akan diperoleh 304 unit percobaan.

3.3.2. Tata Letak Percobaan

Tata letak percobaan selengkapnya dapat dilihat dalam Gambar 3 di bawah ini:

A1B2C1	A1B3C2	A2B1C3	A1B2C4	A2B2C5
A2B3C1	A2B3C2	A1B3C3	A2B2C4	A1B2C5
A1B1C1	A1B2C2	A1B1C3	A1B3C4	A1B3C5
A1B3C1	A2B1C2	A2B3C3	A2B1C4	A2B1C5
A2B1C1	A2B2C2	A1B2C3	A1B1C4	A2B3C5
A2B2C1	A1B1C2	A2B2C3	A2B3C4	A1B1C5

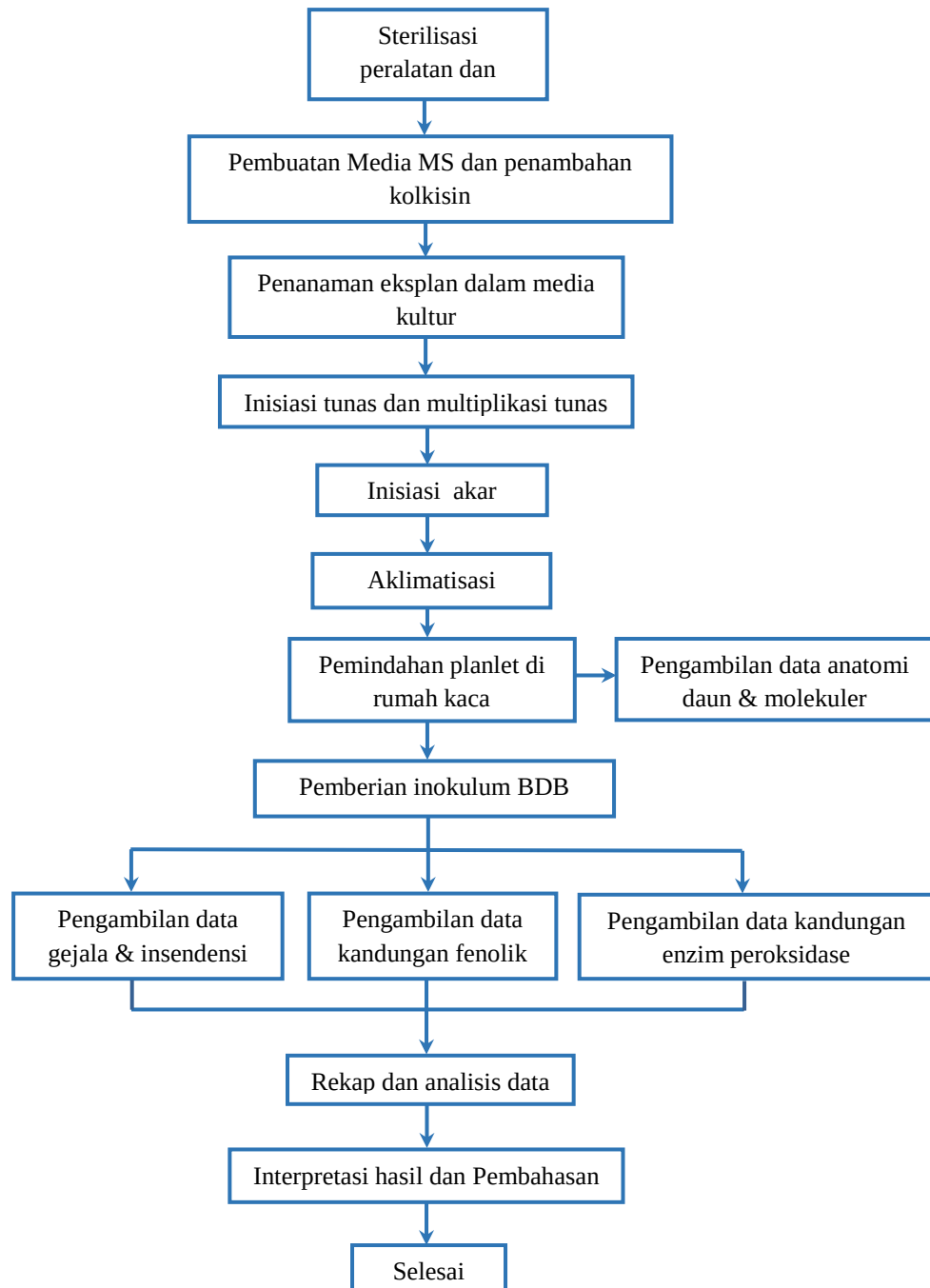
Gambar 3. Tata letak satuan percobaan di rumah kaca

Keterangan :

A1 = Kontrol	A2 = Kolkisin	
B1 = Kepok abu	B2 = Kepok batu	B3 = Kepok kuning
C1 = Ulangan 1	C2 = Ulangan 2	C3 = Ulangan 3
C4 = Ulangan 4	C5 = Ulangan 5	

3.4. Bagan Alir Penelitian

Bagan alir penelitian berikut merupakan penelitian utama



Gambar 4. Bagan alir penelitian

3.5. Prosedur Kerja

3.5.1. Pembuatan Larutan Untuk Perlakuan

Konsentrasi kolkisin 0,1 % dibuat dengan cara melarutkan 1 mg kolkisin sintetis berbentuk kristal dari *Sigma Chemical Co* dalam 99 ml aquades kemudian dihomogenkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.

3.5.2. Kultur Jaringan Pisang Kepok

a. Sterilisasi Alat-alat

Semua peralatan yang digunakan dalam kultur jaringan disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 17,5 psi selama 0,5 jam.

b. Pembuatan Media Kultur

Pada tahap inisiasi tunas digunakan media dasar MS dengan penambahan 0.2 mg/L IAA dan 5 mg/L BA. Media MS yang digunakan untuk multiplikasi tunas ditambahkan 0.5 mg/L IAA dan 5 mg/L BA. Media untuk inisiasi akar adalah media MS dengan penambahan 1 mg/L NAA (Fitrimala dkk., 2016; Supriati, 2010).

Pembuatan media MS sebanyak 1 liter adalah 1 kemasan media MS siap pakai dan bahan tambahan ditimbang sesuai formula tersebut kemudian dilarutkan dengan aquades di dalam labu ukur dan diaduk sampai homogen. Media dipanaskan di atas kompor listrik sambil terus diaduk dan kompor dimatikan setelah larutan terlihat jernih. Media yang masih panas

kemudian dituangkan ke dalam botol-botol kultur yang telah disterilkan dengan volume masing-masing sekitar 20 ml. Mulut botol ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 17,5 psi selama 15 menit. Penambahan kolkisin yang telah disterilkan masing-masing sebanyak 10 ml/l larutan stok MS dilakukan di *laminar air flow* pada waktu media baru selesai diautoklaf dan masih dalam kondisi panas. Media kultur ditutup secara aseptis kemudian media digoyang-goyang agar tercampur secara merata. Seluruh media kemudian diberi label sesuai perlakuan yang telah ditentukan. Media yang telah siap kemudian disimpan dalam ruangan pada suhu kamar.

c. Persiapan dan Sterilisasi Eksplan

Tunas muda yang tumbuh pada bonggol pisang kepok abu, kepok batu dan kepok kuning dibersihkan dengan aquades steril sebelum dipotong-potong seukuran 1 x 5 cm. Tunas kemudian direndam dalam akuades steril yang telah ditetesi Tween 80 selama 1 jam. Setelah itu, tunas disterilisasi kembali dengan tahapan rangkaian sterilisasi sebagai berikut: fungisida Dithane-M45 2 g/L selama 1 jam, bakterisida Agrept 2 g/L selama 1 jam, etanol 70 % selama 1 menit, Bayclin 30 % selama 30 menit, dan terakhir Bayclin 20 % selama 20 menit. Setiap selesai satu tahap sterilisasi, eksplan dibilas akuades steril sebanyak 3 kali (Fitramala dkk., 2016).

d. Penanaman Eksplan dalam Media Kultur

Eksplan yang telah steril ditanam ke dalam botol kultur yang berisi media sesuai kombinasi perlakuan yang telah ditentukan. Dalam satu botol hanya terdapat 1 eksplan. Penanaman eksplan dalam media dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow*.

Media berisi eksplan diinkubasi di ruang kultur pada suhu 25°C, dan disinari dengan lampu neon 40 Watt berjarak sekitar 60 cm dari botol kultur (Nisa dan Rodinah, 2005).

e. Multiplikasi Tunas dan Perakaran Planlet

Multiplikasi tunas dilakukan pada tunas-tunas muda yang dihasilkan dari tahap inisiasi tunas. Tunas muda dikupas pada bagian yang berwarna kehitaman kemudian dibelah membujur menjadi dua bagian. Bahan tersebut digunakan sebagai eksplan baru dan ditumbuhkan pada media kultur yang baru. Pengamatan dilakukan sampai terlihat bagian tunas-tunas yang tumbuh berwarna hijau. Selanjutnya tunas yang dihasilkan dari multiplikasi dipilih yang seragam seukuran 2 cm dan dipindahkan ke media inisiasi perakaran. Kultur eksplan dipelihara dalam ruang inkubasi dengan suhu $25 \pm 2^\circ \text{C}$, disinari lampu TL berkekuatan sekitar 1000 lux dan fotoperiodisitas 16 jam per hari (Fitrimala dkk., 2016).

f. Aklimatisasi Planlet

Planlet yang baik kemudian diaklimatisasi pada media campuran tanah steril dan kompos dengan perbandingan 1 : 1, dan diinkubasi di rumah kaca. Planlet ditutup dengan sungkup plastik untuk menjaga kelembabannya selama 2 minggu. Penyiraman rutin dilakukan setiap hari (Wibowo dkk., 2010).

3.5.3. Infeksi Planlet dengan Inokulum BDB

Uji ketahanan pisang kepok terhadap penyakit BDB dilakukan dengan menginfeksi planlet dengan inokulum BDB. Tanaman pisang disuntik pada bagian leher akar / pangkal akar (*collum*) dengan

suspensi BDB dengan kerapatan 10^8 sel/ml sebanyak 20 ml (Wibowo dkk., 2010).

3.5.4. Pengamatan Parameter

A. Parameter Sitologi

Pengamatan parameter sitologi dilakukan dengan membuat sediaan mitosis semi permanen dari ujung akar planlet. Preparasi mitosis menggunakan modifikasi metode squash dari Gunarso (1980) dan Darnaedi (1991) dengan langkah-langkah sebagai berikut.

a. Pengambilan bahan

Bagian ujung akar planlet yang meristematis dipotong sepanjang ± 1 cm. Pemotongan dilakukan antara pukul 08.30 – 10.00 WIB untuk memperoleh persentase sel bermitosis yang tinggi.

b. Pra perlakuan

Pra perlakuan bertujuan untuk pemisahan dan penguraian kepadatan kromosom, penjernihan sitoplasma, dan pelunakan jaringan (Gunarso, 1988). Bahan untuk pra perlakuan adalah hidroksiquinolin 0,03% . Larutan 8-hidroksiquinolin 0,03 % dibuat dengan memasukkan 0,3 gram 8- hidroksiquinolin ke dalam erlenmeyer ukuran 1 L kemudian ditambahkan aquades sebanyak 1 L. Selanjutnya, larutan dipanaskan di atas *hot plate* pada suhu 60°C . Larutan digojog setiap 15 menit sampai terlarut sempurna, kemudian didinginkan pada suhu ruang sebelum dipindahkan pada botol ukur. Pra perlakuan dilakukan dengan merendam sel akar dalam larutan 8-hidroksiquinolin 0,03% di dalam botol flakon selama 3-5 jam yang disimpan dalam refrigerator dengan suhu $18-20^{\circ}\text{C}$.

Setelah perendaman, potongan akar dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali untuk menghilangkan larutan pra perlakuan.

c. Fiksasi

Fiksasi bertujuan untuk mematikan jaringan tanpa menyebabkan terjadinya perubahan pada komponen sel (Gunarso, 1988). Fiksasi dilakukan dengan merendam potongan akar pada larutan asam asetat 45% selama 10 menit. Potongan akar dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali untuk menghilangkan larutan fiksatif.

d. Hidrolisis

Hidrolisis potongan akar dibutuhkan untuk menyebarkan kromosom sehingga memudahkan penghitungan jumlahnya. Hidrolisis dilakukan dengan memasukkan potongan akar ke dalam gelas beker kecil berisi larutan HCL 1 N dan asam asetat 45% dengan perbandingan 3 : 1. Potongan akar kemudian dipanaskan di atas hot plate pada suhu 60°C selama 3-5 menit sampai sel akar melunak. Potongan akar dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali untuk menghilangkan larutan hidrolisis.

e. Pewarnaan

Pewarnaan kromosom menggunakan pewarna *aceto-orcein* 2 %. Larutan aceto-orcein 2% dibuat dengan menguapkan asam asetat glasial 45 ml dalam gelas piala di atas *hot plate* namun dijaga jangan sampai mendidih. Kemudian ditambahkan orcein 2 gram ke dalam gelas piala sambil digoyang setiap 15 menit selama 1 jam. Larutan kemudian ditambah aquades 55 mL dan didinginkan pada suhu ruang sebelum dipindahkan ke dalam botol reagen 100 mL. Potongan akar yang telah dibersihkan dari larutan hidrolisis diberi larutan pewarna sebanyak 2 ml dan diamkan sampai 2 – 5 menit.

f. *Squashing* (Pemencetan)

Ujung akar yang meristematik diletakkan pada gelas objek dan dipotong sepanjang ± 1 mm. Sampel ditetesi dengan aceto-orcein 2% lalu ditutup dengan gelas penutup kemudian diketuk-ketuk dengan ujung penghapus pada pensil sampai sel akar terlihat menyebar dan tidak ada gelembung udara. Squashing dilakukan dengan penekanan ibu jari di atas sampel. Sediaan mitosis diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x untuk memastikan telah diperoleh penyebaran kromosom yang maksimal. Setelah itu, sediaan diberi kutek di sekeliling tepi gelas penutup. Dan terakhir preparat kromosom semi permanen yang telah siap diberi label identitas, disusun dengan rapi di atas papan sediaan dengan posisi mendatar dan disimpan dalam lemari pendingin. Sediaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x kemudian ditingkatkan sampai perbesaran 1000 x. Pengamatan mikroskop dan perbesaran tinggi membutuhkan bantuan minyak imersi. Preparat yang baik didokumentasikan dengan kamera digital. Pengamatan dan pengukuran parameter sitologi meliputi indeks mitosis, jumlah abnormalitas mitosis dan jumlah kromosom.

Indeks mitosis ditentukan dengan mengamati dan menghitung sel-sel yang berada dalam keadaan interfase, profase, metaphase anafase, dan telofase. Pengamatan dilakukan dengan mengamati setiap fase mitosis yang terjadi pada sediaan, seluas bidang pandang pada lensa mikroskop kemudian sediaan digeser perlahan-lahan secara vertikal dan horizontal sampai sebanyak 10 kali bidang pandang. Penentuan kelainan mitosis (abnormalitas) yang terjadi dilakukan dengan cara membandingkannya dengan mitosis dari sel yang tidak diberi perlakuan (kontrol). Sedangkan

perhitungan indeks mitosis (IM) menggunakan rumus dari Pandey *et al.* (1994), yaitu:

$$IM = \frac{\text{Jumlah sel dalam fase mitosis}}{\text{Jumlah total sel yang diamati}} \times 100\%$$

B. Parameter Anatomi

Daun planlet berumur ± 2 minggu diambil pada posisi yang sama dari setiap tanaman contoh yang diamati. Daun tanaman contoh dikerik menggunakan silet tajam pada salah satu sisi permukaan daun sampai diperoleh suatu lapisan yang tipis (transparan). Klorofil-klorofil yang masih tersisa dibersihkan dengan aquades. Selanjutnya sample diwarnai dengan pewarna safranin dan ditaruh di atas gelas objek dalam medium gliserin 10 %, kemudian ditutup dengan gelas penutup (Dorly, 1989). Irisan membujur daun ini dibuat untuk kedua sisi permukaan daun. Sediaan yang telah siap diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 1000X (dibantu minyak imersi), dan sediaan yang baik kemudian dipotret dengan fotomikrografi.

Parameter anatomi yang diambil dari irisan daun ini adalah tipe, ukuran dan indeks stomata, serta ukuran dan bentuk tepian sel epidermis. Pengukuran dilakukan sebanyak 15 kali pada setiap permukaan, kemudian diambil nilai rata-rata dan ditentukan kisaran yang terendah sampai yang tertinggi. Indeks stomata (IS) dihitung pada 10 bidang pandang dan ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$IS = \frac{\text{Jumlah stomata}}{\text{Jumlah stomata} + \text{Jumlah sel epidermis}} \times 100\%$$

C. Parameter Molekuler

Perubahan pada tanaman contoh akibat mutasi induksi dapat diketahui dari perubahan pada konstitusi gen tanaman tersebut melalui metode analisis DNA menggunakan penanda molekuler SNP (Sutanto dkk., 2013; Anonim, 2017) dengan langkah – langkah kerja sebagai berikut:

1. Ekstraksi DNA

DNA genom sampel berasal dari jaringan daun muda planlet pisang kepok berumur ± 2 minggu menggunakan Dneasy Plant Mini Kit (50) (Qiagen, Cat#69104). Ekstraksi DNA menggunakan mesin QIACUBE . Prosedur ekstraksi daun standar sebelum dilakukan dimasukkan ke dalam mesin Qiacube. Sampel daun pisang kepok segar sebanyak 100 mg diberi 400 μ l AP1, 4 μ l Rnase A stock solution 100mg/ml, kemudian divortex sampai halus selanjutnya *spin down* sebentar untuk menurunkan *drops inside the lid*. Campuran diinkubasi dalam heating block 65⁰C selama 10 menit. Campuran kemudian ditambah 130 μ l buffer sebelum dihomogenkan dan kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit. Campuran sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya *lysate* (500 μ l) dipindahkan ke dalam tube mikrosentrifus 2 ml. Setelah itu, campuran sampel dalam microsetrifus dimasukkan ke dalam mesin Qiacube kemudian mesin diaktifkan dengan mengikuti langkah-langkah pada protokol cara pengoperasiannya. Dari kegiatan ini diperoleh suspensi yang mengandung DNA genom tanaman pisang kepok.

2. Kuantifikasi DNA menggunakan Nanophotometer (P 360)

Sebelum dilakukan pengukuran DNA, sampel dihomogenkan dengan vortex. Sampel diambil dengan pipet dan ditetaskan

di tengah jendela cell pengukur. *Submicroliter cell* yang berisi sampel ditutup rapat. Tombol OK ditekan untuk mengaktifkan mesin dan tombol blank ditekan untuk referensi pengukuran. Tombol ! untuk mengukur sampel. Pengukuran sampel berikutnya dilakukan dengan prosedur yang sama. *Lid* dan *submicroliter cell* harus dipastikan bersih sebelum dipakai kembali. Dari kegiatan ini diperoleh kuantitas dan kemurnian DNA yang baik agar bisa dilanjutkan ke tahap amplifikasi DNA.

3. Desain Primer

Situs SNP terpilih digunakan untuk mendesain pasangan primer SNAP melalui perangkat lunak WebSNAPER di situs <http://ausubellab.mgh.harvard.edu/> (Sutanto, 2013). Primer disintesis menggunakan jasa pembuatan primer.

4. Amplifikasi DNA menggunakan Kit Pyromark PCR

Pyromark PCR master Mix dicairkan, primer, *Rnase-free water* dan 25 mM $MgCl_2$ dicampurkan pada suhu kamar atau pada es. Campuran master dipipet ke atas dan ke bawah agar tercampur sempurna sebelum dimasukkan ke dalam tabung PCR. Setelah itu, DNA template ≤ 500 ng / reaksi ke dalam masing-masing tabung PCR. Program pada mesin PCR disetting terlebih dahulu sesuai manual. Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin dan mulai dioperasikan.

5. Pyrosequencing Menggunakan Pyromark Q24

Sebelum dioperasikan *pyromark Q24 vacuum workstation* telah terpasang dengan sempurna. Larutan sampel yang akan

diuji ditempatkan sesuai dengan posisinya. Pompa vakum kemudian dinyalakan, kemudian filter probe dinyalakan dengan membuka *vacuum switch*. Filter probe dicuci dengan meletakkannya pada *high-purity water* lalu flush probe

dengan 70 ml *high-purity water*. Selanjutnya filter probe dimatikan dan letakkan pada posisi parking (P). Setelah itu, isi kembali *throug* ke 5 dengan 70 ml *high-purity water*. Dilusi *primer pyrosequencing* sampai final konsentrasi 0,375 μ M menggunakan *buffer annealing*, kemudian 20 μ l primer *pyrosequencing* yang telah dilusi dimasukkan ke dalam setiap well pada pyromark Q24 plate. Pyromark Q24 plate dan PCR plate ditempatkan pada posisinya setelah selesai proses imobilisasi produk PCR dengan beads. Filter probe dinyalakan, kemudian filter probe tempatkan di dalam PCR plate dengan hati-hati, ditahan selama 5 detik. Filter probe dipindahkan ke *through* 1 yang berisi etanol 70 %, flush filter selama 5 detik. Kemudian filter dipindahkan ke *through* 2 yang berisi larutan denaturasi, filter di *flush* selama 5 detik, setelah itu dipindahkan ke *through* ke 3 yang berisi larutan buffer dan di *flush* selama 10 detik. Terakhir, *tool* diangkat secara vertikal ke atas 90⁰ selama 5 detik agar cairan mengalir ke dalam filter. Filter probe dimatikan. Filter probe pada pyromark Q24 plate yang sudah berisi primer *pyrosequencing* diletakan sambil digoncangkan pelan-pelan dari sisi ke sisi. Posisi *vacuum switch off*, filter probe dipindahkan ke dalam *through* 4 yang berisi *high-purity water* dan diagitasi selama 10 detik. Kemudian filter dicuci dengan cara memasukkannya ke dalam *through* 5 yang berisi *high-purity water* dan aplikasikan vakum, filter di flush dengan 70 ml *high-purity water*. Setelah itu, *tool* diangkat secara vertikal ke atas 90⁰ selama 5 detik agar cairan mengalir ke dalam filter. *Vacuum switch* ditutup, filter ditempatkan dalam posisi *parking* pada pyromark Q24 *vacuum workstation*, lalu pompa vakum dimatikan.

6. Analisis Data

Analisis hasil menggunakan *software Pyromark Q24* dengan mengikuti manual pada perangkat dan di input ke dalam USB instrument dibandingkan antara dari kontrol dan perlakuan kolkisin 0,1 %.

D. Parameter Perkembangan Gejala dan Tingkat Kejadian Penyakit

Perkembangan gejala penyakit akan diamati setiap hari pada daun pisang dengan mencatat waktu munculnya gejala mengkerut, penguningan, layu, dan nekrosis (Rustam, 2007). Tingkat serangan penyakit dihitung menggunakan rumus :

$$P = a/b \times 100 \%$$

P = serangan penyakit (%)

a = jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit

b = jumlah tanaman yang diamati

E. Parameter Kandungan Fenol

Ketahanan tanaman terhadap serangan patogen dapat diketahui dari kandungan senyawa fenol akar tanaman yang telah terinfeksi. Metode ekstraksi dan fraksinasi dari Echeverri *et al.* (2002) dan Metode Folin-Ciocalteu yang dilakukan Suswati dkk. (2011) digunakan untuk memperoleh data kandungan total senyawa fenol. Akar tanaman sebanyak 100 gram dicuci bersih dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C sampai kadar airnya mencapai 10 %. Akar dipotong kecil-kecil, dihaluskan dan diayak (lolos saringan 180 µm). Sebanyak 10 g tepung akar dimasukkan ke dalam botol dan dimaserasi dalam 100 ml etil asetat selama 3 x 24 jam. Perendaman diulang sebanyak 2 kali. Hasil perendaman disaring dan diuapkan menggunakan *rotary*

evaporator sampai volumenya tinggal 25 %. Selanjutnya, sebanyak 0,001 g fraksi etil asetat akar ditambah dengan 1 ml metanol. Sebanyak 250 μ l maserat ditambah 2.75 ml Reagen Folin Calceur dengan pengenceran 1 : 20 dan 2 ml Na_2CO_3 . Larutan kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 40°C. Kandungan fenolik total ditentukan menggunakan Spektrofotometer UV pada panjang gelombang 765 nm. Pengukuran diulang sebanyak 3 kali untuk setiap unit percobaan.

F. Parameter Kandungan Enzim Peroksidase

Metode *Sunders and McClure* (1975) yang dilakukan Suswati dkk. (2015) digunakan sebagai panduan untuk mengekstraksi enzim peroksidase dari akar tanaman pisang kepok yang terinfeksi BDB. Akar pisang dicuci sampai bersih dan diiris halus secara terpisah. Potongan akar sebanyak 1 g dihaluskan dengan mortar dan secepatnya ditambah 2,5 ml 0,5 M dapar kalium fosfat pada pH 7 dan 0,1 g *Polyvinylpyrrolidone* (PVP). Selanjutnya ekstrak campuran tersebut disaring menggunakan dua lapisan kain kasa dan dihomogenkan dengan sentrifus berkecepatan 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Kadar enzim peroksidase dalam supernatan dibaca dengan Spektrofotometer UV pada panjang gelombang 420 nm. Pengukuran diulang sebanyak 3 kali untuk setiap unit percobaan.

3.6. Analisis Data

Data kuantitatif hasil pengukuran semua parameter yang diamati dianalisis Sidik Ragam dan jika ada perbedaan dilanjutkan dengan uji DMRT pada

taraf 5 %, sedangkan data kualitatif ditelaah menggunakan analisis perbandingan antara data hasil tanaman yang diperlakukan dengan tanaman kontrol.

V. KESIMPULAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Kolkisin sintetis 0,1 % mampu menginduksi resistensi terhadap BDB pada pisang kepok
2. Abnormalitas dan indeks mitosis, ukuran dan indeks stomata, dan kandungan enzim peroksidase dapat dijadikan karakter spesifik yang dapat digunakan sebagai penciri ketahanan pisang kepok terhadap patogen yang diinduksi kolkisin 0,1%.
3. Kepok batu terinduksi 0,1% memiliki potensi resistensi terhadap BDB.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil yang dicapai dari penelitian ini maka dapat dikemukakan beberapa saran sebagai berikut:

1. Jenis media kultur padat perlu diganti dengan media cair untuk meningkatkan peluang semua sel eksplan terpapar oleh mutagen

2. Potensi kepok batu resisten terhadap BDB masih memerlukan studi lebih lanjut untuk dikembangkan sebagai kultivar pisang yang memiliki resistensi dengan menggunakan agen mutasi kolkisin dengan konsentrasi dan waktu pemaparan yang bervariasi sehingga diperoleh hasil yang memiliki validitas yang tinggi
3. Induksi kolkisin dengan variasi konsentrasi dan waktu bervariasi perlu juga diteliti pada kultivar pisang lain yang memiliki nilai ekonomi tinggi
4. Penggunaan marka molekuler untuk studi lanjut perlu dicari marka yang tepat sehingga memperoleh yang lebih akurat dengan validitas yang tinggi

DAFTAR PUSTAKA

- Addink, W. 2002. *Colchicine*. <http://actahort.org/books/502/502-27.htm>. 18/06/2004.
- Addy, H.S., Azizi, N. F., and Mihardjo, P.A. 2016. Detection of Bacterial Wilt Pathogen and Isolation of Bacteriophage from Banana in Lumajang Area, Indonesia. *International Journal of Agronomy*. volume 2016, article ID 5164846, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5164846>.
- Ade, R., and Rai, M.K. 2009. Current Advance in *Gloriosa superba* L. *Biodiversitas*. 10(4): 210-214.
- Ade, R. and Rai, M.K. 2010. Review: Colchicine, current advances, and future prospects. *Bioscience*. 2: 90-96.
- Aeny, T.N., Suharjo, R., dan Mujim, S. 2007. Skrining Bakteri Antagonis *Ralstonia* sp. Penyebab Penyakit Layu Bakteri Pisang di Lampung. *J.HPT Tropika*. 7(2): 100-110.
- Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M., Maryam, Rafay, M., and Iqbal, M. 2013. Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture. *Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci.*, 13 (4): 539-547. DOI: 10.5829/idosi.ajeaes.2013.13.04.1975.
- Ahmed, S., Sharma, A., Singh, A.K., Wali, V.K., and Kumari, P. 2014. In Vitro Multiplication of Banana (*Musa* sp.) cv. Grand Naine. *African Journal of Biotechnology*. 13(27): 2696-2703.
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M.O. 2015. Control of Microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 16(12):711-26. doi: 10.1038/nrm4084.
- Alemu, I.D., and Daba, T.M. 2016. *Gloriosa*, a Source of Colchicine: Review Article. *In. J. Chem. Sci*. 10 (4): 1888-1893.
- Almagro, L., Gomez-Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barcelo, A., and Pedreno, M. A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions,

- Review paper. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2) : 377–390.
doi:10.1093/jxb/ern277.
- Andersen, E.J., Ali, S., Byaukama, E., Yen, Y., and Nepal, M.P. 2018. Disease Resistance Mechanisms in Plants. Review. *Genes* 9, 339 : 1 – 30.
doi:10.3390/genes9070339.
- Anonim. 2004. Pengembangan Buah-Buahan Unggulan Indonesia Komoditas Pisang. Executive Summary. Laporan Akhir Tahun RUSNAS.
- Anonim. 2017. Panduan Pelatihan “Pirosekuensing: Metode dan Aplikasinya”. P.T. Genecraft Lab. UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung. 15 – 17 November. Pp 38.
- Anuradha, C., Chandrasekar, A., Backiyarani, S., and Uma, S. 2022. MusaRgeneDB: an online comprehensive database for disease resistance genes in *Musa* spp. 3 *Biotech* 12: 222. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03285-1>.
- Astutik. 2009. Peningkatan Kualitas Bibit Pisang Kepok melalui Radiasi Gamma secara in vitro. *Buana Sains*. 9(1): 69-75.
- Atichart, P. 2013. Polyploid Induction by Colchicine Treatments and Plant Regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. *Thai Journal of Agricultural Science*. 46(1): 59-63.
- Avivi, Sholeh., Soedaramo, S. H., dan Prasetyo, PA. 2013. Multiplikasi Tunas dan Aklimatisasi Tiga Varietas Pisang: Raja Nangka, Kepok dan Mas. *Jurnal Hort. Indonesia*. 4(2): 83-89.
- Babenko, L.M., Smirnov, O.E., Romanenko, K.O., Trunova, O. K., and Kosakivska, I.V. 2019. Phenolic Compounds in Plants: Biogenesis and Functions. *Ukr. Biochem. J* 91 (3): 1 – 18. UDC 58.036:577/.112/.152.1./19:582.542.11 doi: <https://doi.org/10.15407/ubj91.03.005>.
- Baharuddin, B., Rudolph, K., and Niepold, F. 1994. Production of Monospecific Antiserum Against the Blood Disease Bacterium Affecting Banana and Plantain. *Phytopathology*. 84: 570-575.
- Backriyarani S., Uma, S., Arunkumar, G., Saraswathi, M.S., and Sundararaju, P. 2013. Cloning and characterization of BBS-LRR resistance gene alalogues of *Musa* spp. And their expression profiling studies against *Pratylenchus coffeae*. *African Journal of Biotechnology*. 12(27): 4256-4268.
- Bella, D.R.S., Suminar, E., Nuraini, A., dan Ismail, A. 2016. Pengujian Efektivitas Berbagai Jenis dan Konsentrasi Sitokinin terhadap Multiplikasi

- Tunas Mikro Pisang (*Musa paradisiaca* L.) secara *In Vitro*. *Jurnal Kultivasi*. 15(2): 74-80.
- Bharati, P., Philomina, D., and Chakkaravarthi, S. 2006. Antimitotic Effect of Colchicine from Six Different Species of Gloriosa in Onion Roots (*Allium cepa*). *Journal of Medical Sciences*. 6(3): 420-425.
- Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K. S., Vicente, L.P., Molina, A., Ocimati, W., Poussier, S., and Prior, P. 2017. Bacterial Diseases of Banana and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Front. Plant Sci*. 8: 1290.
- Bai, C., Ge, Y., Ashton, R.W., Evans, J., Milne, A., Hawkesford, M. J., Whalley, W.R., Parry, M.A.J., Melichar, J., Feuerhelm, D., Basler, P.B., and Bartsch, M. 2019. The Relationships Between Seedling Root Screens, Root Growth in the Field and Grain Yield for Wheat. *Plant and Soil*. 440 (1/2): 311-326
- Chakraborty, T., Roy, S., Barman, M., and Ray, S. 2021. Cell Cycle Delay and Colchicine Like Metaphase Inducing Effects of *Scutellaria discolor* Colebr. Herb Aqueous Extract in *Allium cepa* Root Apical Meristem Cells. *Cytologia*. 86(3): 255–260.
- Chen, J., Liu, L., Wang, Z., Zhang, Y., Sun, H., Song, S., Bai, Z., Lu, Z., and Li, C. 2020. Nitrogen Fertilization Increases Root Growth and Coordinates the Root–Shoot Relationship in Cotton. *Front. Plant Sci*. 11:880. doi:10.3389/fpls.2020.00880.
- Chen, X., Zhu, Y., Ding, Y., Pan, R., Shen, W., Yu, X., Xiong, F. 2021. The Relationship Between Characteristics of Root Morphology and Grain Filling In Wheat Under Drought Stress. *Peer J*. 9:e12015 <http://doi.org/10.7717/peerj.12015>.
- Chowdhary, V., Alooparampil, S., Pandya, R.V., and Tank, J.G. 2021. *Physiological Function of Phenolic Compounds in Plant Defense System. Phenolic Compounds - Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications*, Farid A. Badria (eds). DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.101131>.
- Cortaga, C.Q., Latina, R.A., Habunal, R.R., and Lantican, D.V. 2022. Identification and characterization of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) of durian (*Durio zibethinus* L.). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 20:29 <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00313-8>.
- Crowder, L.V. 1997. *Genetika Tumbuhan*. Diterjemahkan oleh Lilik Kusdiarti. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

- Dangariya, M., Khandhar, D., Monpara, J., Chudasama, K., and Thaker, V. 2020. Detection and identification of microbial contaminants from plant tissue culture. *Tropical Plant Research* 7(2): 388–395.
- Daniells, J.W., Jenny, C., Karamura, D.A., Tomekpe, K., Arnaud, E., and Sharrock, S (compi). 2001. *Musalogue* : A catalogue of Musa germplasm. Diversity in the genus Musa. INIBAP, Montpellier, France.
- Darnaedi, D. 1991. Informasi Kromosom. Pelatihan Sitogenetika. PAU Ilmu Hayat, IPB. 5 November 1991. Bogor. 15 pp.
- Davis, R.I., and Liberto, J.R. 2006. Banana Blood Disease (Blood Disease Bacterium). <http://www.padil.gov.au:80/pests-and-diseases/Pest/Main/136649>.
- De Storme, N. and Mason, A. 2014. Plant Speciation through Chromosome Instability and Policy Change: Cellular Mechanisms, Molecular Factors and Evolutionary Relevance. *Current Plant Biology*, 1, 10-33. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2014.09.002>.
- Devi, R.K. Aini, L.Q., dan Abadi, A.L. 2013. Uji Metode Inokulasi dan Patogenesisitas *Blood Disease Bacterium* (BDB) pada Buah Pisang (*Musa* sp.). *Jurnal HPT. Tropika*, 1 (1): 40-46.
- Dmochowska-Boguta, M., Nadolska-Orczyk, A., and Orczyk, W. 2013. Roles of peroxidases and NADPH oxidases in the oxidative response of wheat (*Triticum aestivum*) to brown rust (*Puccinia triticina*) infection. *Plant Pathology* 62, 993–1002 Doi: 10.1111/ppa.12009.
- Dong, Y.S., Fu, C.H., Su, P., Xu, X.P., Yuan, J., Wang, S., Zhang, M., Zhao, C.F., and Yu, L.J. 2015. Mechanisms and Effective Control of Physiological Browning Phenomena in Plant Cell Cultures. *Physiol. Plant.* 156(1): 13-28.
- Dorly. 1989. Membandingkan Anatomi Daun Varietas Orba dan Muria. Laporan Masalah Khusus. IPB. Bogor. 38 hlm.
- Dos Santos, C. and Franco, O.L. 2023. Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. *Plants* 2, 2226. <https://doi.org/10.3390/plants12112226>.
- Dounias, E. 2008. *Gloriosa superba* L. *Protologue Sp.* pl. 1 : 305 (1753).
- Droc, G., Lariviere, D., Guignon, V., Yahiaoui, N., This, D., Garsmeur, O., Dereeper, A., Hameli, C., Argout, X., Dufayard, J-F., Lengelle, J., Baurens, F-C., Cenci, A., Pitollat, B., D'Hont, A., Ruiz, M., Rourd, M., and Bocs, S. 2013. *The Banana Genome Hub*. Database, vol. 2013, DOI: 10.1093/database/bat035.

- Duangkongsan, W., Pothongkhum, K., and Soythong, K. 2016. In Vitro Multiplication of Musa (ABB group) 'Kluai Hin'. *International Journal of Agricultural Technology*, 12 (7.2): 2165-2170.
- Duhoky, M.M.S., and Zibari, P.A.A. 2019. Study of mitotic index percentage by the influence of different concentration of mutagenesis (Colchicine) in different time duration on two varieties of *Crepis capillaries* via tissue culture technique. *Journal of University of Duhok (Agri. And Vet.Sciences)* 22 (2) : 114 – 123.
- Eden-Green, S.J. 1994. *Banana Blood Disease* (Musa Disease Fact Sheet N0. 3). INIBAP, Parc Scientifique Agroplois, Montpellier, France.
- Efri, dan Aeny, T.N. 2004. Keefektifan Ekstrak Mengkudu pada berbagai Konsentrasi terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri *Ralstonia* sp. secara *In Vitro*. *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 4(2): 83-88.
- Eng, W-H., and Ho, W-S. 2019. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. *Scientia Horticulturae* 246: 604–617.
- Ernawati, E., Nurhasanah, E., and Kanedi, M. 2018. Ploidy Level Based on The Chromosomal Counts of Banana Germplasm in Bandar Lampung, Indonesia. *IOSR-JAVS*, 11 (2) Ver. II : 81–83.
- Ewané, C.A., Lepoivre, P. Bellaire, L. L., and Lassois, L. 2012. Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown root. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(3): 393-404.
- Fitrimala, E., Khaerunisa, E., Djuita, N.R., Sunarso, H., dan Ratnadewi, D. 2016. Kultur *In Vitro* Pisang (*Musa paradisiaca* L.) cv. Kepok Merah untuk Mikropropagasi Cepat. *Menara Perkebunan* 84 (2) : 69-75.
- Forster, B.P., and Shu, Q.Y. 2012. *Plant mutagenesis in crop improvement: basic terms and applications*. In: Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H., editors. Plant mutation breeding and biotechnology. Wallingford: CABI; p. 9 - 20.
- Gunarso, W. 1988. *Sitogenetika*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Guo, Z., Gao, Y., Yuan, X., Yuan, M., Huang, L., Wang, S., Liu, C., and Duan, C. 2023. Effects of Heavy Metals on Stomata in Plants: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 24,9302. [https:// doi.org/10.3390/ijms24119302](https://doi.org/10.3390/ijms24119302).
- Gupta, D.R., Khanom, S., Shami, A.Y., Rohman, Md.M., Surovy, M. Z., Mahmud, N.U., Hasanuzzaman, M., Abd-El salam, K.A., Rahman, M., and Islam, T. 2020. Hydrogen Peroxide Detoxifying Enzymes Showed Different Activities at Different Timing in Host and Nonhost Plants Interactions with Wheat Blast Fungus *Magnaporthe Oryzae* Triticum

Pathotype. Preprints (www.preprints.org)
doi:10.20944/preprints202012.0511.v1.

- Hadiwiyono and Widono, S. 2013. Vigor of Plantlet from Microplantlet Treated by Filtrate and Cell Suspension of Some Isolates of *Bacillus* and Resistance to Banana Wilt Pathogen After Acclimatization. *ESci J. Plant Pathol*, 2 (02): 70-75.
- Hadiwiyono. 2010. Insidens Penyakit Layu Bakteri Darah dan Layu Fusarium Pisang di Sambung Macan Sragen dan Tawangmangu Karanganyar. *Agrosains*, 12 (1): 19-23.
- Hadiwiyono. 2011. Blood Bacterial Wilt Disease of Banana: The Distribution of pathogen in Infected Plant, Symptoms, and Potentiality of Disease Tissues as Source of Infective Inoculum. *Bioscience*, 3 (3): 112-117.
- Hanifei, M., Dehghani, H., and Choukan, R. 2013. The Role of Antioxidant Enzymes and Phenolic Compounds in Disease Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* Race 1.2. *Intl. J. Agron. Plant. Prod.* 4 (8), 1985-1996.
- Hapsari, L., Kennedy, J., Lestari, D.A., Masrumi, A., and Lestarini, W. 2017. Etnobotanical Survey of Bananas (*Musaceae*) in Six Districts of East Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 18 (1): 160–174.
- Hapsari, L., and Lestari, D.A. 2016. Fruit Characteristic and Nutrient Values of Four Indonesian Banana Cultivars (*Musa* spp.) At Different Genomic Groups. *Agrivita Journal of Agricultural Science*, 38 (3): 303–311.
- Haworth, M., Marino G., Materassi A., Raschi, A., Scutt, C.P., and Centritto, M. 2023. The functional significance of the stomatal size to density relationship: Interaction with atmospheric [CO₂] and role in plant physiological behavior. Review. *Science of the Total Environment* 863 : 160908. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160908>.
- Hernandez, J.O., Manese, L.G.A., Lalog, H.L., Herradura, V.J.V., Abasolo, W.P., and Maldia, L.S.J. 2023. Growth and Morpho-Stomatal Response of Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) to Varying Water, Light, and Soil Conditions. *Jurnal Sylva Lestari* 11(3): 345-359. DOI: <https://doi.org/10.23960/jsl.v11i3.757>.
- Hu, W., Sarengaowa, Guan, Y., and Feng, K. 2022. Biosynthesis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Front. Microbiol.* 13:906069.
- Hutami, S., Mariska, I., dan Supriati, Y. 2006. Peningkatan Keragaman Genetik Tanaman melalui Keragaman Somaklonal. *Jurnal Agro Biogen*, 2 (2): 81-88.

- INIBAP. 2006. Global Conservation Strategy for Musa (Banana and Plantain). <http://www.inibap.org>.
- Jaffar, N.S., Ramachandran, K., Noor, M.R.M., Maamun, T.A.M.T. 2016. Penyakit Layu BAKteri pada Pisang di Malaysia : Moko atau Penyakit Darah Pisang (BDB). *Buletin Teknologi MARDI*. Bil 9 : 31-39
- Jeloudar N.I., Chamani, E., Shokouhian, A.A., and Zakaria, R.A. 2019. Induction and Identification of Polyploidy by Colchicine Treatment in *Lilium regale*. *Cytologia*. 84(3): 271–276. DOI: 10.1508/cytologia.84.271.
- Jing, P., Yuerong, W.W., and Ou, S. 2011. Polyploidi induction through different concentration of colchicines in *mus acuminata* cv. Mas (AA). *Molecular Plant Breeding*. 8(4): 752 -757.
- Jung, Y., Park, K., Jensen, K.H., Kim, W., and Kim, H-Y. 2019. A design principle of root length distribution of plants. *J. R. Soc.Interface* 16: 20190556. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2019.0556>.
- Jyothirmayi, N., and Rao, N.M. 2015. Banana Medical Uses. *Jour of Med Sc & Tech* 4(2): 152–160.
- Kanchanapoom, K., and Koarapatchaikul, K. 2012. In vitro induction of tetraploid plants from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) ‘Kluai Leb Mu Nang’ and ‘Kluai Sa’. *Euphytica* 183:111–117. DOI 10.1007/s10681-011-0516-9.
- Kaur, S, Samota, M.K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A.K., Sharma, A., and Thakur, J. 2022. How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiol Mol Biol Plants* 28(2): 485–504. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01146-y>.
- Kaysar, M.S., Sarker, U.K., Monira, S., Hossain, M.A., Haque, M.S., Somaddar, U., Saha, G., Chaki, A.K., Uddin, M.R. 2022. Dissecting the Relationship between Root Morphological Traits and Yield Attributes in Diverse Rice Cultivars under Subtropical Condition. *Life* 12, 1519. <https://doi.org/10.3390/life12101519>.
- Kerduwan, N., and Te-chato, S. 2012. Effects of colchicine on survival rate, morphological, physiological and cytological characters of chang daeng orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) In Vitro. *Journal of Agricultural Technology*. 8(4): 1451-1460.
- Kertasapoetra, A.G. 1988. *Pengantar Anatomi Tumbuh-Tumbuhan* (tentang sel dan jaringan). Bina Aksara. Jakarta, hal: 97–99.

- Khamrit, R., and Jongrungklang, N. 2022. In vitro tissue culture techniques and colchicine-induced polyploidy in banana (*Musa*, AA group) 'Kluai Khai'. *Asian J. Plant Sci.*, 21 (1): 111-118. DOI: 10.3923/ajps.2022.111.118.
- Kharkwal, M.C., and Shu, Q.Y. 2009. *The role of induced mutations in world food security*. In: Shu QY, editor. Induced plant mutations in the genomics era. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. p. 33 - 38.
- Kulbat, K. 2016. The role of phenolic compounds in plant resistance . *Biotechnol Food Sci* 80 (2), 97-108.
- Kumar, S., Abedin, Md.M., Singh, A.K. and Das, S. 2020. *Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms. Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*, R. Lone et al. (eds.). Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22.
- Kundu, L.M., and Ray, S. 2017. Mitotic abnormalities and micronuclei inducing potentials of colchicine and leaf aqueous extracts of *Clerodendrum viscosum* Vent. in *Allium cepa* root apical meristem cells, *Catologia*, 70:1, 7-14, DOI: 10.1080/00087114.2016.1254452.
- Kurniasih, D., Murdaningsih, H.K., Ruswandi, D., and Qosim, W.A. 2019. Increasing resistance of chrysanthemum to white rust disease: the role of mutant genotypes and enzymes activities. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 308 012064 doi:10.1088/1755-1315/308/1/012064.
- Kusumoto, S., Aeny, T.N, Mujimu, S., Ginting, C., Tsuge, T., Tsuyumu, S., and Takikawa, Y. 2004. Occurrence of Blood Disease of Banana in Sumatra, Indonesia. *J. Gen Plant Pathol*, 70: 45-49.
- Kwon, S-J., Seo, D-Y., Cho, G-Y., Lee, M-S., Moon, Y-J., Boo, H-O., Woo, S-H., and Kim, H-H. 2016. Effect of Colchicine on Chromosome Doubling in *Codonopsis lanceolate*. *Korean J. Plant Res.* 29(3):347-354.
- Lakshmi, P.T. and Swathi, S. 2015. Estimation of Colchicine in Tuber, Seed and Leave Samples of *Gloriosa superba* Using HPLC and Their Antibacterial Studies on Pathogenic Strains. *International Journal of Natural Products Research*, 5 (3): 34 – 41.
- Lande, M.L, Yulianty, dan Puspitasari, R. 2011. Keanekaragaman Tanaman Pisang (*Musa* spp.) di Kabupaten Pasawaran Propinsi Lampung. Prosiding Seminar Nasional Konservasi Tumbuhan Tropika: Kondisi Terkini dan Tantangan ke Depan. UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Cibodas – LIPI. Bogor ISBN: 978-979-99448-6-3.

- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T., and Cardinali, A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, 23-67 ISBN: 81-308-0034-9.
- Lattanzio, V. 2013. Phenolic Compounds: Introduction. K.G. Ramawat, J.M. Me´rillon (eds.), *Natural Products*, DOI 10.1007/978-3-642-22144-6_57, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.
- Leiwakabessy, C. 2003. Potensi Beberapa Jenis Serangga dalam Penyebaran Penyakit Darah Pisang (*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al.). *Jurnal Pertanian Kepulauan*. 2(2): 137-145.
- Li, W., Cao, G., Zhu, M., Zhang, Y., Zhou, R., Zhao, Z., Guo, Y., Yang, W., Zheng, B., Tan, J., and Sun, Y. 2022. Isolation, Identification and Pollution Prevention of Bacteria and Fungi during the Tissue Culture of Dwarf Hygro (*Hygrophila polysperma*) Explants. *Microorganisms*, 10,2476. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122476>.
- Mairawita, Habazar, T., Hasyim, A., dan Nasir, N. 2012a. Potensi *Trigona* spp. sebagai Agen Penyebab Bakteri *Ralstonia solanacearum* Phylotipe IV Penyebab Penyakit Darah pada Tanaman Pisang. *J.HPT Tropika*, 12(1): 92-101.
- Mairawita, Habazar, T., Hasyim, A., Nasir, N., dan Suswati. 2012b. Potensi Serangga Pengunjung Bunga sebagai vector Penyakit Darah Bakteri (*Ralstonia solanacearum* Phylotipe IV) pada Pisang di Sumatera Barat. *Jurnal Entomologi Indonesia*. 9(1): 38-47.
- Maksimov, I.V., Abizgildina, R.R., Sorokana, A.V., and Burkhanova, G.F. 2014. Regulation of Peroxidase Activity under the Influence of Signaling Molecules and *Bacillus subtilis* 26D in Potato Plants Infected with *Phytophthora infestans*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 50 (2) : 173 – 178.
- Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M.A., Hafiz, I.A., and Silvestri, C. 2019. Studies on Colchicine Induced Chromosome Doubling for Enhancement of Quality Traits in Ornamental Plants. *Plants*, 8, 194; doi:10.3390/plants8070194.
- Mancho-Sanchez, G., Buenorosto-Nava, M.T., Guzman-Gonzales, S., Orozco-Santos, M., Youssef, M., and Medrano, R.M.E. 2015. *Genetic Diversity in Banana and Plantains (Musa spp.)*, in *Agriculture and Biological Sciences: Molecular Approach to Genetic Diversity*. Mahmut Caliskan, Guul Cevahir Oz, I. Halil Kavakli and Birguul Ozcan (Ed). ISBN 978-953-51-2042-1, DOI: 10.5772 / 5942.
- Meddya, S., Meshram, S., Sarkar, D., S, R., Datta, R., Singh, S., Avinash, G., Kondeti, A.K., Savani, A.K., and Thulasinathan, T. 2023. Plant Stomata:

- An Unrealized Possibility in Plant Defense against Invading Pathogens and Stress Tolerance. *Plants*, 12, 3380. [https:// doi.org/10.3390/plants12193380](https://doi.org/10.3390/plants12193380).
- Megbo, B.C. 2010. The physiological effects of Colchicine in Okra, *Hibiscus esculentus* L, plant growth and development. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 1 (1) : 29 – 33. <http://www.ijser.org>.
- Megia, R. 2005. *Musa* sebagai Model Genom. *Ulasan. Hayati*, 12 (4):167-170.
- Meitha, K., Fatmawati, I., Dwivany, F.M., Sutanto, A., Pratama, S.N., Nugrahapraja, H., and Wikantika, K. 2020. Phylogenetic analysis of 23 accessions of Indonesian banana cultivars based on Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) region. *Indonesian Journal of Biotechnology* 25(1) : 1- 11.
- Minaeva, O.M., Akimova, E. E., Tereshchenko, N. N., Zyubanova, T. I., Apenysheva, M.V., and Kravets, A.V. 2018. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65 (5) : 717–725.
- Mishra, V.K., Biswas S.K., and Rajik, M. 2011. Biochemical Mechanism of Resistance to Alternaria Blight by Different Varieties of Wheat. *International Journal of Plant Pathology*, 2: 72-80.
- Moghbel, N., Borujeni, M.K., and Bernard, F. 2015. Colchicine Effect on The DNA Content and Stomata Size of *Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera and *Carthamus tinctorius* L. Cultured *in Vitro*. *J. Genet Eng Biotechnol*. 13 (1): 1–6.
- Msogoya T., Kanyagha, H., Mutigitu, J., Kulebelwa, M., and Mamiro, D. 2012. Identification and management of microbial contaminants of banana *in vitro* cultures. *J. Appl. Biosci*. 55: 3987– 3994.
- Mukhopadhyay, J.M., Lahiri, K., and Mukhopadyay, S. 2008. *In Vitro* Microtuberization and Enhanced Colchicine Accumulation in Two Species of *Gloriosa*. *Cytologia*, 73 (4): 357-363.
- Mydlarz, L.D., and Harvell, C.D. 2006. Peroxidase activity and inducibility in the sea fan coral exposed to a fungal pathogen. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, doi:10.1016/j.cbpa.2006.09.005.
- Naipospos, N., Miftahudin, dan Sobir. 2014. Identifikasi Morfologi dan Marka Molekuler Terpaut Sifat Tidak Berbunga Jantan pada Mutan Pisang Kepok. *J.Hort*. 24 (1): 23–31.
- Nautiyal, O.P. 2011. Isolation of 3-demethylcolchicine from *Gloriosa superba* sludge and coupling with α -acetobromoglucose to yield cholchicoside and thiocolchicoside. *Journal of Natural Products*. 4 : 87-93.

- Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T.A., and Waals, J. E. 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Dis.* 96:186-192.
- Nisa, C dan Rodinah. 2005. Kultur Jaringan Beberapa Kultivar Buah Pisang (*Musa paradisiaca* L.) dengan Pemberian Campuran NAA dan Kinetin. *Bioscientiae*, 2 (2): 23-36.
- Nunes, T.D.G., Zhang, D., and Raissig, M.T. 2020. Form, development and function of grass stomata. *The Plant Journal* 101, 780–799. doi: 10.1111/tpj.14552.
- Oladosu, Y., Rafii, M.Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H.A., Miah, G., and Usman, M. 2016. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30 :1, 1-16, DOI: 10.1080/13102818.2015.1087333.
- Oratmanguna, K.M., Pandianganana, D., dan Kandou, F.E. 2017. Deskripsi Jenis-Jenis Kontaminan Dari Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Jurnal MIPA UNSRAT online* 6 (1): 47-52.
- Palupi, H.T. 2012. Pengaruh Jenis Pisang Dan Bahan Perendam terhadap Karakteristik Tepung Pisang (*Musa* spp.). *Jurnal Teknologi Pangan*, 4 (1): 102–120.
- Pandey, R., Shukla, R., and Datta, S. 1994. Chromosome effects of one fungicide (dithane M-45) and two insecticides (aldrex-30 and metacid-50). *Cytologia*, 59 : 419-422.
- Parnidi, Soetopo, L., Damanhuri, dan Marjani . 2021. Ketahanan Beberapa Genotipe *Hibiscus cannabinus* terhadap *Meloidogyne incognita*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 17 (3) : 103–112. DOI: 10.14692/jfi.17.3.103–112.
- Ploetz, R.C., Kema, G.H.J., and Ma, L.J. 2015. Impact of Disease on Export and Smallholder Production of Banana. *Ann. Rev. Phytopathol*, 53 : 13.1-13.20.
- Poerba, Y.S., Martanti, D., Handayani, T., and Witjaksono. 2019. Morphology and Reproductive Function of Induced Autotetraploid Banana by Chromosome Doubling. *SABRAO J. Breed. Genet.* 51 (2) 175-190.
- Poerba, Y.S., Martanti, D., Handayani, T., and Witjaksono. 2021. Induction and Characterization of Autotetraploid Mas Jambe Banana Using Oryzalin Treatment. *The 8th Annual Basic Science International Conference AIP Conf. Proc.* 2021, 070019-1–070019-9. <https://doi.org/10.1063/1.5062817>.

- Poerba, Y.S., Witjaksono, Ahmad, F., dan Handayani, T. 2014. Induksi dan Karakterisasi Pisang Mas Lumut Tetraploid. *Jurnal Biologi Indonesia* 10(2): 191-200 (2014).
- Poerba, Y.S., Imelda, M., dan Martanti, D. 2012. Analisa Kestabilan Genetik Pisang Kepok ‘Unti Sayang’ Hasil Mikropropagansi dengan Marka RAPD dan ISSR. *Berita Biologi*. 11(2) : 275-282.
- Prasannath, P. 2017. Plant defense-related enzymes against pathogens: A Review. DOI: <http://doi.org/10.4038/agrieast.v11i1.33>.
- Redsway, T.D.M. 2014. Insidensi Penyakit Darah Pisang di Kabupaten Minahasa Utara. *Jurnal Ilmiah Sains* 14(1): 35–45.
- Retnoningsih, A., Megia, R., dan Hartana, A. 2010. Molecular Verification and Diversity Analysis of Indonesian BB, AAB, and ABB Banana Cultivars. *Tree and Forestry Sciences and Biotechnology*, 4 (Special Issue 1): 69–76.
- Riastiwi, I. 2017. Inventarisasi Penyakit Tanaman Pisang Koleksi Kebun Plasma Nutfah, Cibinong Science Center-BG. *Jurnal Mikologi Indonesia*, 1 (1) : 38-44.
- Izarra, M.L., Panta, A.L., Maza, C.R., Zea, B.C., Cruzado, J., Gutarra, L.R., Rivera C.R., Ellis, D., and Kreuze J.F. 2020. Identification and Control Introduction of Latent Bacteria in vitro Cultures of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Front. Plant Sci.* 11:903. doi:10.3389/fpls.2020.00903.
- Rizal, M., dan A. Triwidyawati. 2015. Prospek Pengembangan Pisang Kepok di Kaupaten Kutai Timur, Kalimantan Timur. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 1 (8): 2006-2010.
- Rodriguez F.A., Soares, J.D.R., Santos, R.R., Pasqual, M., and Silva, S.O. 2011. Colchicine and amiprophos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant . *African Journal of Biotechnology*. 10(62) : 13476-13481.
- Roychowdhury, R., and Tah, J. 2013. *Mutagenesis a potential approach for crop improvement*. In: Hakeem KR, Ahmad P, Ozturk M, editors. *Crop improvement: new approaches and modern techniques*. New York (NY): Springer. p. 149-187.
- Rustam. 2007. Uji Metode Inokulasi dan Kerapatan Populasi Blood Disease Bacterium pada Tanaman Pisang. *J. Hort.*, 17 (4): 387-392.
- Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., and Villanueva-Cañongo, C. 2019. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds in Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.83815>.

- Sajjad, Y., Jaskani, M.J., Mehmood, A., Ahmad, I., and Abbas, H. 2013. Effect of Colchicine on in Vitro Polyploidy Induction in African Merigold (*Tagetes erecta*). *Pak. J. Bot.*, 45(3): 1255-1258.
- Sebastian, K., Bindu, B. and Arya, M.S. 2023. *Recent Advances and Achievements in Mutation Breeding of Fruit Crops: A Review*. *Agricultural Reviews*. doi:10.18805/ag.R2616.
- Sekhwai, M.K., Li, P., Lam, I., Wang, X., Cloutier, S., and You, F.M. 2015. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants, Review. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 19248-19290; doi:10.3390/ijms160819248.
- Shigeto J., and Tsutsumi, Y. 2015. Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytologist* (2016) 209: 1395–1402 doi: 10.1111/nph.13738.
- Shofiyani, A., dan Damajanti, N. 2017. Pengembangan metode sterilisasi pada berbagai eksplan guna meningkatkan keberhasilan kultur Kencur (*Kaempferia galangal* L.). *Agritech* 17 (1): 55 – 64 DOI: [10.30595/agritech.v17i1.1345](https://doi.org/10.30595/agritech.v17i1.1345).
- Shu, Q.Y., Brian, P., Forster, H., Nakagawa. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture Plant Breeding and Genetics Section, International Atomic Energy Agency. CABI ; FAO, Wallingford, Oxfordshire, UK, Cambridge, MA.
- Sobir, Rozyandra, C., dan Darma, K. 2006. Studi Keragaman Morfologi Aksesi Pisang Koleksi dari Kabupaten Lampung Selatan. *Floribunda*, 3 (1): 19-27.
- Soedjono, S. 2003. Aplikasi Mutasi Induksi Dan Variasi Somaklonal Dalam Pemuliaan Tanaman. *Jurnal Litbang Pertanian* 22 (2).
- Sraghsyan, A., Shakyan, H., and Nazaryan, K. 2023. Effect of colchicine binding site inhibitors on the tubulin intersubunit interaction. *ACS Omega*. 8(32):29448-29454. doi: 10.1021/acsomega.3c02979.
- Suhaimi, N.S.M., Laboh, R., Ajam, N., and Thong, K.L. 2017. Antagonistic Effect of Biofilm-Forming Bacterial Strains Co-Inoculation With Blood Disease Pathogenic Strain, *Ralstonia solanaceae* subspecies *solanaceae* in Banana Plants. *Europe Journal Plant Pathol*, 148 : 13-26.
- Suharjo, R., Subandiyah, S., dan Martono, E. 2008. Hubungan antara Frekuensi Kedatangan Imago *Erionota thrax* pada Bunga Pisang dan Keterjadian Penyakit Layu Bakteri Pisang pada Lahan Sawah, Tegalan dan Pekarangan. *J. HPT Tropika*, 8 (1): 47-54.

- Suhartanto, M.R., Sobir and Harti, H. 2010. Pengembangan Pisang Kepok Unti Sayang melalui Penerapan Good Agricultural Practices (GAP). *Prosiding Seminar Hasil*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Supriadi. 2011. Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*): Dampak, Bioekologi, dan Peranan Teknologi Pengendaliannya. *Pengembangan Inovasi Pertanian*, 4 (4): 279-293.
- Supriati, Y. 2010. Efisiensi Mikropropagasi Pisang Kepok Amorang melalui Modifikasi Formula Media dan Temperatur. *Jurnal Agro Biogen.*, 6 (2) : 91-100.
- Surekha, CH., Neelapu, NRR., Prasad, B.S., and Ganesh, P.S. 2014. Induction of Defense Enzymes and Phenolic Content by *Trichoderma viride* in *Vigna mungo* Infested with *Fusarium Oxysporum* and *Alternaria alternate*. *International Journal of Agriculture Science and Research (IJASR)* 4 (4): 31-40.
- Suresh, L., and Sankar, P.D. 2016. Curbing the Menace of Contamination in Plant Tissue Culture. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(3), p. 2145-2152.
- Suswati, Habazar, T., Husin, E.F., Nasir, N., Putra, D.P., dan Taylor, P. 2011. Senyawa Phenolik Akar Pisang CV. Kepok (*Musa acuminata*) yang Diinduksi dengan Fungi Mikoriza Arbuskular Indigenus PU10-Glomus sp 1 terhadap Penyakit Darah Bakteri. *Jurnal Natur Indonesia*, 13 (3): 207-213.
- Suswati, Indrawaty, A., dan Friardi. 2015. Aktivitas Enzim Peroksidase Pisang Kepok dengan Aplikasi Glomus Tipe 1. *J. HPT Tropika*. 15 (2) : 141-151.
- Sutanto, A., Hermanto, C., Sukma, D., dan Sudarsono. 2013. Pengembangan Marka SNAP Berbasis *Resistance Gene Analogue* Pada Tanaman Pisang (*Musa spp.*). *J. Hort.*, 23 (4): 300–309.
- Sutanto, A., Sukma, D., Hermanto, C., and Sudarsono. 2014. Isolation and characterization of Resistance Gene Analogue (RGA) from *Fusarium* resistant banana cultivars. *Emir. J. Food Agric.* 26 (6): 508-518 doi: 10.9755/ejfa.v26i6.17219.
- Tahakik, R., Shukre, V.M., Giram, P., and Jadhao, V. 2023. Colchicine-Induced Polyploidy Induction in Garlic (*Allium sativum* L.) and its effect on Mortality of In-Vitro Propagated Plants. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2706595/v1>.
- Teng, S.K., Aziz, N.A.A., Mustafa, M., Laboh, R., Ismail, I.S., Sulaiman, S.R., Azizan, A.A., and Devi, S. 201x. The Occurrence of Blood Disease of Banana in Selangor, Malaysia. *International Journal of Agriculture and Biology*. 00:000- 000.

- Till, B.J., Jankowicz-Cieslak, J., Sa'gi, L., Hyunh, O.A., Utsushi, H., Swennen, R., Terauchi, R., and Mba, C. 2010. Discovery of Nucleotide Polymorphisms in The Musa Gene Pool by Ecotilling. *Theor Appl Genet* 121: 1381-1389.
- Tirnaz, S., Bayer, P.E., Inturrisi, F., Zhang, F., Yang, H., Dolatabadian, A., Neik, T.X., Severn-Ellis, A., Patel, D.A., Ibrahim, M.I., Pradhan, A., Edwards, D., and Batley, J. 2020. Resistance Gene Analogs in the Brassicaceae: Identification, Characterization, Distribution, and Evolution. *Plant Physiology* 184: 909–922, www.plantphysiol.org.
- Tiwari, A.K., and Mishra, S.K. 2012. Effect of colchicine on mitotic polyploidization and morphological characteristics of *Phlox drummondii*. *African Journal of Biotechnology* 11(39) : 9336-9342. DOI: 10.5897/AJB11.2196.
- Twalla, J.T., Ding, B., Gaoyi, C., Bao, S., Li, M., Chen, X., Xie, X., and Wang, J. 2021. Roles of stomata in gramineous crops growth and biomass production. Review. *Cereal Research Communications*. DOI : <https://doi.org/10.1007/s42976-021-00216-3>.
- Udage, A.C. 2021. Introduction to plant mutation breeding: Different approaches and mutagenic agents. *The Journal of Agricultural Sciences* 16 (3) : 466 – 483 <http://doi.org/10.4038/jas.v16i03.9472>.
- UNCST. 2007. The Biology of Banana and Plantains. UNCST in Collaboration with PBS.
- Valmayor, R.V., Jamaludin, S.H. Silayoi, B., Kusumo, S., Danh. L.D., Pascua, O.C., Espino, R.R.C. 2003. Banana Cultivar Names and Synonyms in Southeast Asia. <http://www.inibap.org>.
- Varghese, N, and Joy, P.P. 2016. Plant Tissue Culture Contaminants Identification and Its Response to Fumigation. <https://www.researchgate.net/publication/306034945>.
- Vilcherrez-Atoche, J.A., Silva, J.C., Clarindo, W.R., Mondin, M., Cardoso, J.C. 2023. In Vitro Polyploidization of *Brassolaeliocattleya* Hybrid Orchid. *Plants*. 12, 281. <https://doi.org/10.3390/plants12020281>.
- Weissinger, H., Gosch, C., Abdel-Fattah, H., Spornberger, A., and Stich, K. 2013. Peroxidase activity in roots and root exudates of strawberry – linked to the resistance to root pathogens?. *Mitteilungen Klosterneuburg* 63 (2013): 208-212.
- Wibowo, A., Joko, T., dan Subandiyah, S. 2010. Peningkatan Ketahanan Pisang Kepok Kuning terhadap Penyakit Darah Melalui Variasi Somaklonal Dan

- Simbiosis Endofitik. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 16 (1): 15 - 21.
- Widoretno, W., Azriningsih, R., Sukmadjaja, D., and Rosyidah, M. 2023. In vitro induction and identification of polyploid *Amorphophallus muelleri* blume plants by colchicine treatment. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 45(1), 87–97. <http://doi.org/10.17503/agrivita.v45i1.3992>.
- Xie. X., Yan, H., and Zeng, L. 2022. Characterizing plant root parameters with deep learning-based heat pulse method. *Geoderma*, vol. 406. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115507>.
- Yang, X., Xu, Q., Le, L. T. Zhaou, Yu, W., Wang, G., Fu, F., and Cao, F. 2022. Comparative histology, transcriptome, and metabolite profiling unravel the browning mechanisms of calli derived from ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *J. For. Res.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s11676-022-01519-9>.
- Yuskianti, V., and Isoda, K. 2012. Genetic Diversity of *Acacia mangium* Seed Orchard in Wonogiri Indonesia Using Microsatellite Markers. *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(3), 141. <https://doi.org/10.4308/hjb.19.3.141>.
- Zagoskina, N.V., Zubova, M.Y., Nechaeva, T.L., Kazantseva, V.V., Goncharuk, E.A., Katanskaya, V.M., Baranova, E.N., and Aksenova, M.A. 2023. Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>.
- Zhao. P., Wang, Y., Yan, S., Fan, L., Wang, Z., Zhou, Q., Jiepan, Y., Cheng, Q., Wang, Z., and Huang, L. 2019. Electrical imaging of plant root zone: A review. *Computers and Electronics in Agriculture* 167. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.105058>.