

**DINAMIKA EVOLUSI DAN FILOGEOGRAFI PISANG RAJA (*Musa spp.*)
DI WILAYAH JAWA TIMUR, JAWA TENGAH, DAN JAKARTA
BERDASARKAN DAERAH ITS (*Internal Transcribed Spacer*)**

SKRIPSI

Oleh :

LUTFIANA HASANAH GUSMIATI

14620018



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**DINAMIKA EVOLUSI DAN FILOGEOGRAFI PISANG RAJA (*Musa spp.*)
DI WILAYAH JAWA TIMUR, JAWA TENGAH, DAN JAKARTA
BERDASARKAN DAERAH ITS (*Internal Transcribed Spacer*)**

SKRIPSI

Diajukan Kepada: Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang untuk
Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Oleh:

LUTFIANA HASANAH GUSMIATI

NIM. 14620018

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2018

**DINAMIKA EVOLUSI DAN FILOGEOGRAFI PISANG RAJA (*Musa spp.*)
DI WILAYAH JAWA TIMUR, JAWA TENGAH, DAN JAKARTA
BERDASARKAN DAERAH ITS (*Internal Transcribed Spacer*)**

SKRIPSI

Oleh :

**LUTFIANA HASANAH GUSMIATI
NIM. 14620018**

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal: 26 Juni 2018

Dosen Pembimbing I



Didik Wahyudi, M.Si
NIP.19860102201801 1001

Dosen Pembimbing II



Umaiatus Syarifah, M. A
NIP. 198209252009012005

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP.19810201200901 1019

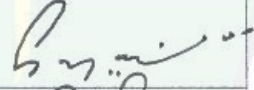
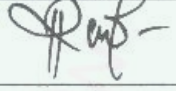
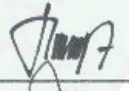
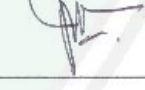
**DINAMIKA EVOLUSI DAN FILOGEOGRAFI PISANG RAJA (*Musa spp.*)
DI WILAYAH JAWA TIMUR, JAWA TENGAH, DAN JAKARTA
BERDASARKAN DAERAH ITS (*Internal Transcribed Spacer*)**

SKRIPSI

Oleh:

LUTFIANA HASANAH GUSMIATI
NIM. 14620018

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 26 Juni 2018

Penguji Utama	: Suyono, M.P NIP. 19710622 200312 1 001	
Ketua Penguji	: Ruri Siti Resmisari, M.Si NIDT. 19790123 20160801 2 063	
Sekretaris Penguji	: Didik Wahyudi, M.Si NIP. 19860102201801 1001	
Anggota Penguji	: Umaiatus Syarifah, M.A NIP. 198209252009012 005	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romadhoni M. Si., D.Sc.
NIP. 19840201 200901 1019

MOTTO

“ Identify your passion and then design your future”

Temukan passion-mu dan kemudian buatlah masa depanmu



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lutfiana Hasanah Gusmiati
 NIM : 14620018
 Jurusan : Biologi
 Fakultas : Sains dan Teknologi
 Judul Skripsi : Dinamika Evolusi dan Filogeografi Pisang Raja (*Musa spp.*)
 di Wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah, dan Jakarta
 Berdasarkan Daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tugas akhir/skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tugas akhir/skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 26 Juni 2018

menyatakan



Lutfiana Hasanah Gusmiati
 NIM. 14620018

PERSEMBAHAN

Sebuah karya sederhana yang penulis persembahkan kepada:

***Ayahanda Gusnadi dan Ibunda Sumiyati tercinta yang selalu memberikan
kasih sayang dan doanya***

***Adik Ifa dan Farida yang menjadikan motivasi penulis untuk segera dapat
menyelesaikan karya***

Calon pendamping hidup yang selalu mendampingi penulis

***Sahabat-sahabat teman seperjuangan dalam Banana Team
(Rasya, Affan dan Nurul)***

Dan almamterku tercinta kampus Ulul Albab

UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur penulis panjatkan kepada kehadirat Allah yang telah memberikan nikmat yang sangat melimpah sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi sebagai salah satu sayarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si). Shalawat serta salam selalu terlimpah curahkan kepada pemimpin umat yakni Nabi Muhammad S.A.W yang telah menunjukkan menuju jalan kebenaran.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini telah mendapatkan banyak bantuan dan semangat dari berbagai pihak, oleh karena itu dengan segala kerendahan dan ketulusan hati, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Bapak Romaidi, M.Si, D.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak Didik Wahyudi, M.Si dan Ibu Umaiatus Syarifah, M.Si selaku Dosen Pembimbing skripsi dan konsultan yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
5. Bapak Suyono, M.P dan Ibu Ruri Siti Resmisari, M.Si selaku dosen penguji yang memberikan kritik dan saran sehingga tugas akhir terselesaikan.
6. Ibu Dr. Retno Susilowati, M.Si selaku Dosen Wali yang telah memberikan dukungan dan semangat sehingga penulisan skripsi dapat terselesaikan..
7. Mas Machrus Ismail, M.Si selaku laboran yang telah memberikan banyak bantuan hingga skripsi terselesaikan.
8. Seluruh dosen, laboran dan staff ddministrasi jurusan biologi yang telah membantu dan memberikan kemudahan, terimakasih atas ilmu dan bimbingannya.

9. Kedua orang tua penulis Bapak Gusnadi, S.Ag dan Ibu Sumiyati, S.Pd.I yang telah melimpahkan doa motivasi kepada penulis.
10. Seluruh teman Biologi angkatan 2014, teman seperjuangan dalam *banana team* yaitu Rasya, Affan dan Nurul serta semua pihak yang memberikan dukungan baik moril maupun materil dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhirnya, penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Karena kesempurnaan hanya milik Allah. Untuk itu, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi para pembaca pada umumnya. Amiin Yaa Ya Rabbal'alam

Malang, Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERNYATAAN.....	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
المستخلص	xvii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.5 Hipotesis	8
1.6 Batasan Masalah	9
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Botani Pisang	10
2.1.1 Botani Pisang Umum	10
2.1.2 Pisang Raja.....	19
2.1.3 Syarat Tumbuh Tanaman Pisang	22
2.1.4 Persebaran Pisang.....	23
2.2 Variasi Genetik	25
2.3 Filogenetik dan Evolusi	26
2.4 Filogeografi.....	28
2.5 Pendekatan Molekuler	29
2.6 ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)	30
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Rancangan Penelitian.....	32
3.2 Waktu dan Tempat.....	32
3.3 Alat dan Bahan	32
3.4 Prosedur Penelitian	33
3.4.1 Sampel DNA	33
3.4.2 Ekstraksi DNA	34

3.4.3 Analisa Kualitatif dan Kuantitatif	37
3.4.4 Amplifikasi dan <i>Sequencing</i> Daerah ITS.....	39
3.5 Analisis Data	40
3.5.1 Analisis sekuen dan Variasi Genetik.....	40
3.5.2 Analisis Filogenetik	40
3.5.3 Analisis Haplotipe.....	42
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Variasi Genetik Pisang Raja	44
4.2 Hubungan Kekerabatan dan Evolusi Pisang Raja	53
4.2.1 Similaritas Genetik.....	59
4.3 Keragaman haplotipe	61
 BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	67
5.2 Saran	68
 DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN.....	79

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	<i>Cladogram</i> Ordo Zingiberales	12
Gambar 2.2	Perawakan Umum Tumbuhan Pisang	13
Gambar 2.3	Karakter Berdasarkan Warna <i>Pseudosteum</i>	14
Gambar 2.4	Karakter Warna Getah.....	14
Gambar 2.5	Bercak pada <i>petiole</i>	14
Gambar 2.6	Tipe Pangkal Daun Pisang	16
Gambar 2.7	Berbagai Bentuk Braktea Pisang.....	16
Gambar 2.8	Penampakkan Organ Generatif pada Pisang	17
Gambar 2.9	Keberadaan Biji Pada Pisang	19
Gambar 2.10	Perawakan Tandan Buah Pisang	21
Gambar 2.11	Karakteristik Buah Pisang Raja.....	21
Gambar 2.12	Penampakkan Buah Pisang Raja	21
Gambar 2.13	Titik Persebaran <i>section</i> Musa	25
Gambar 2.14	Gambaran Letak daerah ITS	31
Gambar 4.1	Diagram Panjang Basa Hasil <i>Sequencing</i>	45
Gambar 4.2	Diagram Batang Persentase Nilai QV20+.....	46
Gambar 4.3	Diagram Batang Kandungan Basa Nukleotida.....	48
Gambar 4.4	Pohon Filogenetik <i>Maximum parsimony</i> (MP)	57
Gambar 4.5	Pohon Filogenetik <i>Neighbor joining</i> (NJ).....	58
Gambar 4.6	Pohon Filogenetik <i>Maximum likelihood</i> (ML).....	58
Gambar 4.7	Pohon Filogenetik Metode Bayesian.....	59
Gambar 4.8	Haplotipe Yang Terbentuk	66

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Kode, Nama Lokal dan Asal Daerah Koleksi Pisang Kombinasi....	34
Tabel 3.2	Kode, Asal Daerah dan Kondisis Geografis Wilayah Pisang Raja .	34
Tabel 4.1	Hasil BLAST Sekuen Daerah ITS	46
Tabel 4.2	Kategori Variasi Genetik	49
Tabel 4.3	Similaritas Genetik 11 Pisang Raja	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Hasil Ekstraksi DNA 9 Pisang Raja dan 2 Pisang <i>Outgroup</i>	79
Lampiran 2	Hasil Kuantitatif (Kemurnian dan Konsentrasi DNA)	79
Lampiran 3	Hasil Amplifikasi Daerah ITS	80
Lampiran 4	Hasil Sekuensing 11 sampel	80
Lampiran 5	Persentase Nilai QV20+	82
Lampiran 6	Hasil <i>Alignment</i> dengan Custal X2	82
Lampiran 7	Kandungan Basa Nukleotida	83
Lampiran 8	Analisis Variasi Genetik	83
Lampiran 9	Analisis Haplotipe	84

ABSTRAK

Gusmiati, Lutfiana Hasanah. 2018. **Dinamika Evolusi dan Filogeografi Pisang Raja (*Musa spp.*) di Wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah, dan Jakarta Berdasarkan Daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*)**. Skripsi Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing : (I) Didik Wahyudi, M.Si (II) Umaiatus Syarifah, M.A.

Kata Kunci : Pisang Raja, sekuensing, variasi genetik, filogenetik, haplotipe

Pisang merupakan salah satu tumbuhan yang mudah tumbuh di Indonesia dan beranekaragam jenisnya. Pusat keanekaragaman pisang di Indonesia tersebar di pulau Jawa, Madura, Sulawesi dan Sumatera. Salah satu pisang yang banyak diproduksi dan terdistribusi di wilayah Indonesia adalah pisang Raja. Banyaknya pemanfaatan pisang Raja oleh masyarakat mengakibatkan pembudidayaan pisang Raja terjadi di berbagai daerah di Indonesia. Hal ini menimbulkan permasalahan tata nama pisang Raja yang berbeda di setiap daerah di Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta. Oleh karena itu, perlunya klarifikasi tata nama pisang Raja dengan mencari tahu evolusi dan filogeografi pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

Penelitian ini menggunakan 9 sampel pisang Raja (*in-group*) dan 2 sampel pisang liar sebagai (*outgroup*). Jenis penelitian ini adalah deskriptif kualitatif eksploratif. Tahap penelitian yang dilakukan adalah uji kualitatif, kuantitatif dan amplifikasi menggunakan primer ITS1 dan ITS4. Data analisis yang digunakan adalah variasi genetik, filogenetik dengan metode (MP, ML, NJ dan Bayesian), similaritas genetik dan haplotipe.

Daerah ITS pada pisang Raja teramplifikasi pada panjang ± 700 bp. Variasi genetik seluruh sampel tergolong tinggi. Pengelompokan 4 pohon filogenetik mengacu berdasarkan genom dari masing-masing pisang Raja yang digunakan. Keempat pohon filogenetik dikelompokkan menjadi 4 *clade* (*in-group*) dan 1 *clade* (*outgroup*). Similaritas genetik tertinggi dimiliki Raja Brentel dan Raja Bali yaitu 89,426 % dan terendah oleh Raja Gareng dan Raja Seribu dengan persentase 56,823 %. Terbentuk 11 haplotipe yang mengelompok menjadi 4 jaringan haplotipe. Diduga evolusi pisang Raja berasal dari nenek moyangnya yaitu *M. acuminata* dan *M. balbisiana*. Filogeografi yang terbentuk dimulai dari aliran gen pisang Raja berdasarkan daerah ITS di wilayah Jawa Tengah kemudian menuju Jawa Timur dan Jakarta. Aliran gen pisang Raja berdasarkan daerah ITS yang diawali dari wilayah Jawa Tengah diduga akibat banyaknya pemanfaatan pisang Raja oleh masyarakat Jawa Tengah untuk kebutuhan sehari-hari khususnya ritual keagamaan di kerajaan maupun keraton seperti kesultanan Yogyakarta. Hal tersebut mengakibatkan pisang Raja sangat dibutuhkan sehingga banyak ditanam dan dibudidayakan di wilayah Jawa Tengah.

ABSTRACT

Gusmiati, Lutfiana Hasanah. 2018. **The Dynamics of Evolution and Phylogeography of Raja Banana (*Musa spp.*) in East Java, Central Java, and Jakarta Based on ITS (Internal Transcribed Spacer)**. Thesis Department of Biology. Faculty of Science and Technology. State Islamic University (UIN) Maulana Malik Ibrahim of Malang. Supervisor : (I) Didik Wahyudi, M.Si (II) Umaiatus Syarifah, M.A.

Keywords : *Raja banana, sequencing, genetic variation, phylogenetic, haplotype*

Banana is one of the plants that are easy to grow in Indonesia and diverse kinds. The center of banana diversity in Indonesia is spread over the islands of Java, Madura, Sulawesi and Sumatra. One of the bananas that are widely produced and distributed in Indonesia is Raja Banana. The number of utilization of Raja banana by society resulted in cultivation of Raja banana occurred in various regions in Indonesia. This raises the issue of different banana kingdom nomenclature in each region in East Java, Central Java and Jakarta. Therefore, the need for clarification of the king's banana nomenclature by finding out the evolution and philosophy of Raja banana in East Java, Central Java and Jakarta based on ITS (Internal Transcribed Spacer).

This study used 9 samples of banana king (in-group) and 2 samples of wild bananas as (outgroup). The type of this research is descriptive qualitative explorative. The research stages are qualitative, quantitative and amplification using primary ITSL and ITS4. Analytical data used are genetic, phylogenetic variation by method (MP, ML, NJ and Bayesian), genetic similarity and haplotype.

The area of the ITS on the Raja banana is amplified at length ± 700 bp. The genetic variation of the entire sample is high. Grouping of 4 phylogenetic trees refers to the genomes of each Raja banana used. The four phylogenetic trees are grouped into 4 clade (in-group) and 1 clade (outgroup). The highest genetic similarity is owned by Raja Brentel and Raja Bali that is 89.426% and the lowest by Raja Gareng and Raja Seribu with percentage of 56.823%. Formed 11 haplotypes that cluster into 4 haplotype networks. Allegedly the evolution of the Raja banana comes from his ancestors namely *M. acuminata* and *M. balbisiana*. The phylogeography that was formed started from the flow of Raja banana genes based on ITS area in Central Java and then to East Java and Jakarta. Raja Banana genes flow based on ITS area that begins from the Central Java region allegedly due to the many uses of Raja banana by the people of Central Java for daily needs, especially religious rituals in the kingdom and the palace like the Sultanate of Yogyakarta. This resulted in a much needed Raja Banana so much planted and cultivated in the region of Central Java.

المستخلص

كوسمياتي، لطفيينا حسنة 2018، دينامية تطويرية و فيلوجيوجرافي موز الجنة (*Musa spp.*) في منطقة جاوا الشرقية، جاوا الوسطى و جاكرتا إستنادا إلى المنطقة ITS (فاصل يدون الداخلية). أطروحة إدارة علم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانق. المشرف الأول (١) ديديك وحيودي الماجستير، المشرفة الثانية (٢) أمية الشريفة الماجستير.

الكلمات المفتاحية : موز الجنة، التسلسل، التنوع الوراثي، النشوء والتطور، هابلوتيبي

يعد الموز من الأعشاب التي تسهل أن تنمو في إندونيسيا، ومجموعة متنوعة من نوعه. نشر مركز التنوع للموز في إندونيسيا في جزيرة جاوا، ومادورا، سولاويسي و سومطرة. واحدة من العديد من الموز التي تنتج وتوزع في منطقة إندونيسيا هي موز الجنة. أسفرت عن عدد كبير من استفادة موز الجنة بالاجتماع يحدث زراعة الموز في مختلف المناطق في إندونيسيا. وهذا يثير إلى مشكلة التسميات الموز الجنة التي تختلف في كل منطقة في جاوا الشرقية وجاوا الوسطى وجاكرتا. ولذلك، الحاجة إلى توضيح مصطلحات موز الجنة مع معرفة تطور موز الجنة وفيلوجيوجرافي في منطقة جاوا الشرقية وجاوا الوسطى وجاكرتا إستناداً إلى مجال لها (فاصل نسخها الداخلية).

تستخدم هذه الدراسة تسعة عينيات من موز الجنة (تدقيق) وعينان الموزان البريان (أووتجروب). نوع هذا البحث هو الوصفي الإستكشافي النوعي. مرحلة البحوث التي أجريت اختبار الكمي والنوعي للتضخيم باستخدام التمهيدي ITS4 و ITS1 تحليل البيانات المستخدمة هي التنوع الوراثي، بأساليب النشوء والتطور (النائب ومل، نيوجيرسي والنظرية الافتراضية)، سيميلاريتاس الوراثية وهابلوتيبي.

المنطقة التي لها على التضخيم موز الجنة على الطول $700 \pm$ شركة بريتيش بتروليوم. ينتمي التنوع الوراثي في جميع أنحاء العينة. يتم استخدام النشوء والتطور إلى أربعة شجرة تشير فيها إستناداً إلى الجينوم من كل موز الجنة المستخدمة. أربعة أشجار النشوء والتطور يتم تجميعها في أربعة طور (تدقيق) وطور الواحد (أووتجروب). سيميلاريتاس الوراثية الأعلى مملوكة الملك برينتيل و الملك بالي أي ٨٩,٤٢٦ في المائة وأقل من الملك هو ملك جارنج و ملك ألف بنسبة ٥٦,٨٢٣ في المائة. تجمعت إحدى عشر هابلوتيبي التي شكلت إلى أربعة الشبكة الهابلوتيبية. يحرص التطور المفترض موز الجنة ينبع من بلده الآباء ألا وهي م. اكمينتا و م. باليسيانا. وشكلت فيلوجيوجرافي بدءاً من تدفق الجينات موز الجنة إستناداً إلى المنطقة في جاوا الوسطى، جاوا الشرقية، ومن ثم التوجه إلى جاكرتا. وادعي تدفق موز الجنات إستناداً إلى بدايتها للمنطقة من جاوا الوسطى نظراً للعدد الكبير من الإستفادة موز الجنة بالاجتماعات من جاوا الوسطى للاحتياجات اليومية للطقوس الدينية خاصة في المملكة، فضلا عن القصر سلطنة يوجياكرتا. وهذا الحال يأتى إلى أشد الإحتياجات إلى موز الجنة حيث زرعت الكثير وتزرع في منطقة جاوا الوسطى.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman merupakan gambaran dari variasi sifat atau penampilan yang terdapat pada tingkatan ekosistem, jenis dan genetik di dalam suatu organisasi kehidupan (Schaltegger dan Bestandig, 2012). Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman tumbuhan yang tinggi karena hampir berbagai macam tanaman dapat tumbuh di Indonesia. Di dalam al-Qur`an telah dijelaskan oleh Allah SWT tentang keanekaragaman tumbuhan yang diciptakan-Nya serta memerintahkan manusia supaya memperhatikan keanekaragaman yang ada di bumi, disertai seruan kepada manusia agar merenungkan ciptaan-ciptaan-Nya yang amat menakjubkan. Hal tersebut tertulis di dalam firman Allah SWT al-Quran surat ar-Rad (13):4;

فِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَاوِرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِنْ أَعْنَابٍ وَزَرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ وَغَيْرُ صِنَوَانٍ يُسْقَى
بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفِضِلُ بَعْضَهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأُكُلِ ۚ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ (٤)

Artinya: *“Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon kurma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berpikir”*. (QS. ar-Rad (13):4)

Kata *قِطْعٌ مُتَجَاوِرَاتٌ* dalam ayat di atas menerangkan bahwa Allah SWT telah menciptakan *“bagian-bagian yang berdampingan”* hal ini merujuk pada makhluk Allah SWT yang diciptakan secara berdampingan di alam semesta. Kata

“berdampingan” yang dimaksudkan adalah tanah-tanah yang berdekatan antara satu dengan yang lain. Pada bagian tanah yang baik dapat menumbuhkan tanaman beranekaragam dan berguna bagi manusia sedangkan tanah yang berpasir asin tidak dapat menumbuhkan suatu tanaman. Demikian pendapat yang diriwayatkan oleh Ibnu Abbas, Mujahid dan Sa’id bin Jubair (Katsir, 2004). Dalam ayat ini Allah SWT memberikan beberapa contoh bukti beranekaragamnya tumbuhan yang diciptakan-Nya seperti kata *وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ* yang berarti kebun anggur dan kata *وَنَخِيلٍ صِنْوَانٍ وَغَيْرِ صِنْوَانٍ* yang berarti pohon kurma yang bercabang dan tidak bercabang (Katsir, 2004).

Salah satu tanaman yang memiliki keanekaragaman tinggi di Indonesia adalah pisang (*Musa spp.*) (Damayanti, 2007). Pisang (*Musa spp.*) juga menjadi salah satu buah yang berperan penting sebagai sumber vitamin dan mineral (Goswami, 2011). Pisang (*Musa spp.*) kaya akan karbohidrat, vitamin C, riboflavin, thiamin dan rendah kolesterol (Hapsari dan Lestari, 2016). Dalam 100 gram buah pisang matang, terkandung energi sebanyak 73,43 kalori hingga 148,8 kalori (Hapsari dan Lestari, 2015).

Pisang (*Musa spp.*) adalah buah istimewa yang dijanjikan Allah SWT kepada kaum golongan kanan di surga. Firman Allah SWT mengenai hal ini tertulis di dalam al-Qur’an surat al Waqiah (56): 27-31;

وَأَصْحَابُ الْيَمِينِ مَا أَصْحَابُ الْيَمِينِ (٢٧) فِي سِدْرٍ مَخْضُودٍ (٢٨) وَطَلْحٍ مَّنْضُودٍ (٢٩)
وَوَظِلٍّ مَّمْدُودٍ (٣٠) وَمَاءٍ مَّسْكُوبٍ (٣١)

Artinya: ” Dan golongan kanan, alangkah bahagianya golongan kanan itu. Berada diantara pohon bidara yang tidak berduri, dan pohon pisang yang bersusun-

susun (buahnya), dan naungan yang terbentang luas, dan air yang tercurah.” (QS. al-Waqi’ah (56): 27-31)

Dalam surat al Waqiah, yang dimaksud dengan الطلح adalah merujuk pada arti pisang (Mandzur, 1993). Hal ini merupakan pendapat mayoritas para ulama dari kalangan sahabat dan tabi’in yang disebutkan oleh para ahli Tafsir (ar-Razi, Ibnu Katsir, asy-Syaukani, al-Qurtubi, dan ath-Thabari rahimahumullah).

Pisang (genus *Musa*) dan kerabatnya *Ensete* serta *Musella* termasuk dalam famili *Musaceae* (Busaidi, 2013). Berdasarkan pola persebarannya, pisang (*Musa* spp.) memiliki empat *section* diantaranya *Australimusa*, *Callimusa*, *Eumusa* dan *Rhodochlamys* (Busaidi, 2013). Persebaran *Eumusa* terpusat di wilayah Asia Timur, kecuali wilayah Melanesia bagian timur. *Rhodochlamys* tersebar di sekitar dataran iklim basah di Asia bagian selatan dan *Australimusa* tersebar dari Indonesia bagian timur hingga Filipina bagian selatan sedangkan *Calimusa* tersebar di wilayah Vietnam bagian selatan, Malaysia, Borneo dan Sumatra (Busaidi, 2013).

Komoditas buah dunia sampai saat ini masih didominasi oleh pisang (*Musa* spp.), yakni 47% dari total produksi buah dunia (Megia, 2005). Selain itu, buah pisang (*Musa* spp.) juga menjadi komoditas hortikultura dari kelompok buah-buahan bagi masyarakat Indonesia (Purwaradia, 2006). Hal ini terbukti berdasarkan produksi pisang (*Musa* spp.) tahun 2016 yang mengalami peningkatan sekitar 1,45% dibandingkan tahun sebelumnya (Badan Pusat Statistik, 2018). Berdasarkan rata-rata produksi pisang nasional, sekitar 63% produksi pisang (*Musa* spp.) didominasi dari pulau Jawa, 18% dari Sumatera, 6%

dari Kalimantan, 6% dari Sulawesi, dan 8% dari Bali dan Nusa Tenggara. Hal inilah yang menjadikan pulau Jawa sebagai pusat sentra produksi pisang (*Musa spp.*) di Indonesia (FAO, 2016).

Pisang (*Musa spp.*) yang ada sekarang merupakan golongan dari *section* Eumusa yang tersebar di wilayah Asia Tenggara (Busaidi, 2013). Pisang-pisang hasil hibridisasi atau perkawinan silang yang saat ini dibudidayakan disebut pisang kultivar. Beberapa pisang kultivar yang diunggulkan di Indonesia antara lain, pisang Ambon, Pisang Raja, Pisang Kepok dan Pisang Tanduk (Nasution dan Yamada, 2001). Pisang Raja dan Pisang Ambon menjadi pisang yang banyak ditemukan di Indonesia khususnya di pulau Jawa (Zuhairini, 1997). Pisang Raja banyak terdistribusi di wilayah pulau Jawa, seperti di Sukabumi dan Cianjur (Jawa Barat), Demak (Jawa Tengah) dan Lumajang (Jawa Timur). Pemanfaatan pisang Raja sebagai buah yang sering dikonsumsi telah lama dikenal masyarakat Indonesia. Namun demikian, pisang Raja juga dapat digunakan sebagai obat tradisional (Heyne, 1987; Kasrina, 2013) dan keperluan ritual serta upacara-upacara adat (Firdausi, 2015; Pramita, 2013).

Pisang Raja memiliki banyak nama lokal diantaranya pisang Raja Seribu (Jakarta), pisang Raja Delima (Jawa Timur), dan pisang Raja Gareng (Jawa Tengah) (Singh *et al.*, 2001). Banyaknya penggunaan nama lokal pisang Raja di berbagai daerah, menimbulkan adanya perbedaan nama pada satu kultivar pisang Raja. Hal ini menjadi permasalahan dalam tata nama pisang Raja yang juga berkaitan dengan klarifikasi genom sehingga perlu dilakukan penelitian untuk

mengetahui kesesuaian nama dengan genom yang dimiliki dengan menelusuri keterkaitan antara evolusi dan wilayah geografis pisang Raja.

Penamaan pisang pertama kali dideskripsikan oleh Linneus berdasarkan ciri buahnya, seperti banyaknya kandungan pati di dalam buah sehingga perlu dimasak terlebih dahulu sebelum dikonsumsi. Pisang ini tergolong dalam kategori *cooking banana* dengan nama ilmiah *Musa paradisiaca* sedangkan untuk pisang yang dapat langsung dikonsumsi tergolong *dessert banana* dengan nama ilmiah *Musa sapientum* (Valmayor *et al.*, 2000). Namun, penamaan pisang seperti di atas tidak berlaku lagi di wilayah Asia Tenggara yang menjadi *center origin of banana* (Simmonds, 1959; Espino *et al.*, 1992) dengan keanekaragaman pisang yang dimiliki diberbagai daerah. Oleh karena itu, pada tahun 1955 diusulkan perubahan sistem klasifikasi dan tata nama pisang kultivar oleh Simmonds dan Shepherd. Sistem tata nama pisang Simmonds dan Shepherd menggunakan tata nama berdasarkan genom dan telah ditetapkan secara konsensus untuk tata nama pisang kultivar di Asia Tenggara pada tahun 1999 (Valmayor *et. al.*, 2000; INIBAP, 2006).

Sistem tata nama pisang berdasarkan genom berdasarkan dugaan bahwa pisang kultivar yang ada sekarang merupakan keturunan dari *Musa acuminata* dan *Musa balbisiana* (Simmonds, 1959). Pisang-pisang kultivar yang ditemukan saat ini memiliki komposisi genom yang berasal dari kedua tetua pisang liar yaitu *Musa acuminata* dengan simbol genom “A” dan *Musa balbisiana* dengan simbol “B”. Persilangan antara kedua tetua pisang liar tersebut akan menghasilkan hibrid-hibrid diploid (AB), triploid (AAB dan ABB) serta tetraploid (AAAB, AABB,

dan ABBB) (Simmonds, 1996) sehingga pisang-pisang kultivar saat ini telah berevolusi dari pisang dahulu yang umumnya memiliki biji menjadi pisang-pisang yang tanpa biji.

Selama ini, untuk mengetahui tata nama taksonomi pisang berdasarkan genom banyak menggunakan pendekatan morfologi (fenetik) (Simmonds dan Shepherd, 1955; Simmonds, 1959; Jumari dan Pudjoarinto, 2000; Surahman, *et al.*, 2005; Hapsari *et al.*, 2011; Hapsari *et al.*, 2015a; Hapsari *et al.*, 2015b; Hapsari *et al.*, 2016). Namun, penggunaan pendekatan morfologi masih bersifat subyektif dan karakter morfologi yang diidentifikasi dapat dengan mudah dipengaruhi oleh faktor lingkungan sehingga berpengaruh terhadap konsistensi hasil (Guzow-Krzeminsk *et al.*, 2001). Oleh sebab itu diperlukan pendekatan berbasis molekuler (de Jesus *et al.*, 2013; Hapsari *et al.*, 2015) untuk mendapatkan hasil yang lebih valid (Guzow-Krzeminsk *et al.*, 2001).

Beberapa pendekatan molekuler yang sering digunakan untuk identifikasi tumbuhan diantaranya: AFLP (Wong *et al.*, 2002), RFLP (Nwakanma *et al.*, 2003a; Ekasari *et al.*, 2012), ISSR (Silvia *et al.*, 2017), RAPD (Pillay *et al.*, 2000; Sukartini, 2008; Uma *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2009) dan DNA spesifik (Hribova, 2011; Pachuau, 2014; Janssens *et al.*, 2016). Namun, pendekatan menggunakan sekuen DNA spesifik dinilai lebih akurat untuk mengetahui variasi genetik (Janssens *et al.*, 2016). Beberapa sekuen DNA yang sering digunakan untuk identifikasi pisang adalah ITS (Li LF *et al.*, 2010; Liu, 2010), *rbcl* (Handique *et al.*, 2013), *trn-L* (Retnoningsih *et al.*, 2014), *MatK* (Davy *et al.*, 2013) dan *atpB* (Lamare, 2016). Namun demikian, daerah spesifik ITS merupakan

sekuen DNA spesifik yang paling cocok digunakan untuk analisis pada pisang, khususnya untuk identifikasi atau klarifikasi genom (Hapsari *et al.*, 2015), analisis filogenetik (Davey *et al.*, 2013) dan histori evolusi serta biogeografi (Janssens *et al.*, 2016). Oleh sebab itu, pentingnya dilakukan penelitian evolusi dan filogeografi pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan sekuen spesifik ITS, dengan harapan hasilnya nanti dapat digunakan sebagai informasi dasar klarifikasi tata nama pisang Raja dan sebagai acuan dasar dalam pemuliaan tanaman pisang.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana variasi genetik pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah ITS ?
2. Bagaimana evolusi pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah ITS ?
3. Bagaimana hubungan filogeografi yang terbentuk pada pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah spesifik ITS ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk:

1. Menjelaskan variasi genetik pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah spesifik ITS.

2. Menjelaskan hubungan kekerabatan dan evolusi pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah spesifik ITS.
3. Menjelaskan hubungan filogeografi yang terbentuk pada pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah spesifik ITS.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi terkait evolusi dan filogeografi Pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah ITS.
2. Memberikan konsep dasar sebagai acuan pemuliaan pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta.
3. Memberikan inspirasi untuk penelitian selanjutnya mengenai penamaan pisang Raja maupun pisang lainnya di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta.
4. Menambah informasi tentang kekayaan plasma nutfah dan menjadi landasan dalam upaya pengelolaan, pengembangan potensi serta manfaat khususnya bagi ilmu pengetahuan dan masyarakat pada umumnya.

1.5 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variasi genetik pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah ITS tergolong tinggi.

2. Evolusi pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta berdasarkan daerah ITS berasal dari kedua nenek moyang pisang liar.
3. Filogeografi yang terbentuk diawali dari wilayah Jawa Tengah yang kemudian menyebar ke dataran lainnya di pulau Jawa.

1.6 Batasan Masalah

Pada penelitian ini terdapat batasan masalah sebagai berikut:

1. Pengambilan sampel daun pisang muda dan menggulung dilaksanakan di Kebun Plasma Nutfah Pisang, Dinas Pertanian dan Pangan, Giwangan Kota Yogyakarta, kemudian disimpan dengan *silica gel* sebelum diekstraksi.
2. Pisang koleksi yang dianalisis diantaranya ;
 - a. Raja Delima
 - b. Raja Gareng
 - c. Raja Sereh
 - d. Raja Kisto
 - e. Raja Bali
 - f. Raja Brentel
 - g. Raja Lini
 - h. Raja Kutuk
 - i. Raja Seribu
3. Sekuensing dilakukan pada daerah spesifik *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dengan primer *forward* ITS-L (TCG TAA CAA GGT TTC CGT AGG TG) (Hsiao *et al.*, 1994) dan *reverse* ITS-4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (White *et al.*, 1990) (Biotechnology, Surrey, UK).
4. Pembuatan pohon filogenetik menggunakan metode pendekatan *maximum parsimony*, *neighbor joining*, *maximum likelihood*, dan bayesian.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Botani Pisang

2.1.1 Botani Pisang Umum

Klasifikasi tanaman pisang secara umum (Tjitrosoepomo, 1993):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatopyhta
Kelas	: Monocotyledonae
Ordo	: Zingiberales
Familia	: Musaceae
Genus	: Musa
Spesies	: <i>Musa</i> sp

Pohon pisang merupakan tumbuhan yang istimewa, karena disebutkan di dalam al-Quran surat al Waqiah (56): 27-31;

أَصْحَابُ الْيَمِينِ مَا أَصْحَابُ الْيَمِينِ (٢٧) فِي سِدْرٍ خَضُودٍ (٢٨) وَطَلْحٍ
مَنْضُودٍ (٢٩) وَظِلٍّ مَمْدُودٍ (٣٠) وَمَاءٍ مَسْكُوبٍ (٣١)

Artinya: " Dan golongan kanan, alangkah bahagianya golongan kanan itu. Berada diantara pohon bidara yang tidak berduri, dan pohon pisang yang bersusun-susun (buahnya), dan naungan yang terbentang luas, dan air yang tercurah." (QS. Al-Waaqi'ah: 27-31).

Kata الطلح dipahami dalam arti pohon pisang atau pohon (Shihab, 2002). Dalam kitab *Lisanul arab*, kata الطلح memiliki beberapa arti (Mandzur, 1993) diantaranya (1) Pohon yang berasal dari negara Hijaz (mayoritas masyarakat negro), (2) Pohon yang tinggi dan dapat digunakan berteduh untuk manusia dan

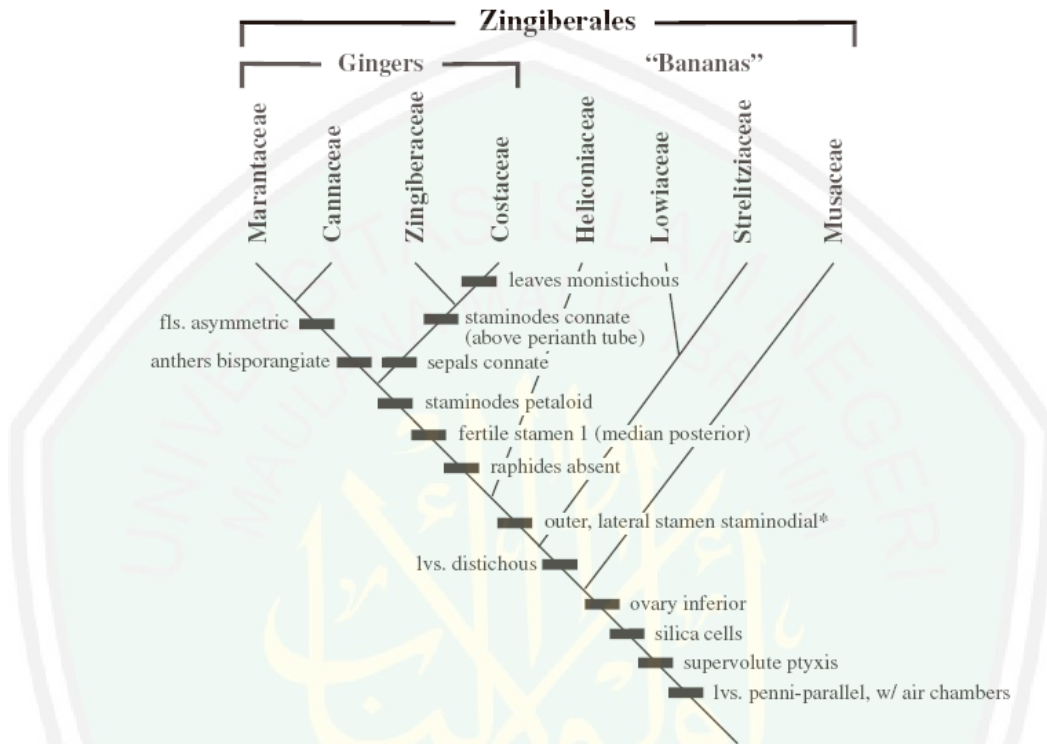
unta, (3) Pohon yang daunnya sedikit dan tangkai yang besar, dan (4) Pohon yang memiliki tunas dan mayoritas daunnya berwarna hijau. Berdasarkan ciri-ciri tersebut, maka الطح mengarah pada morfologi dari pohon pisang (Shihab, 2002).

Hal ini dikuatkan oleh Katsir (2004) dalam tafsirnya menjelaskan bahwa kalimat yang artinya “*berada diantara pohon bidara yang tidak berduri*” yaitu pohon yang dipenuhi oleh buah. Sama halnya dengan kata “*bersusun-susun*” yang dimaksudkan adalah bersusun pada buah pisang. Ibnu Jarir juga mengatakan dalam syairnya bahwa kata “*pohon*” yang dimaksud adalah pohon pisang (Ibnu Katsir, 2004). Pisang merupakan salah satu buah surga dengan pohon dan dahan yang lembut, serta buahnya yang saling berdekatan (Sheikh, 2004). Al-Qur’an surat al-Waqi’ah (Hari Kiamat) menyebutkan dimana terbagi menjadi tiga golongan saat peristiwa penghisapan amal perbuatan, yaitu golongan orang yang bersegera menjalankan kebaikan, golongan kanan dan golongan yang celaka. Buah pisang adalah buah surga yang di peruntukkan bagi golongan kanan (penerima catatan amal perbuatan melalui tangan kanan atau orang mukmin) sebagai salah satu balasan amal perbuatan.

Pisang bukanlah tumbuhan yang berasal dari semenanjung Arab. Namun dahulu, kemungkinan besar orang Arab telah mengenal pisang karena buah tersebut diperkirakan ditanam untuk pertama kali di wilayah Mediterania sekitar tahun 650 M, yaitu pada zaman kebangkitan Islam (Zein, 2004).

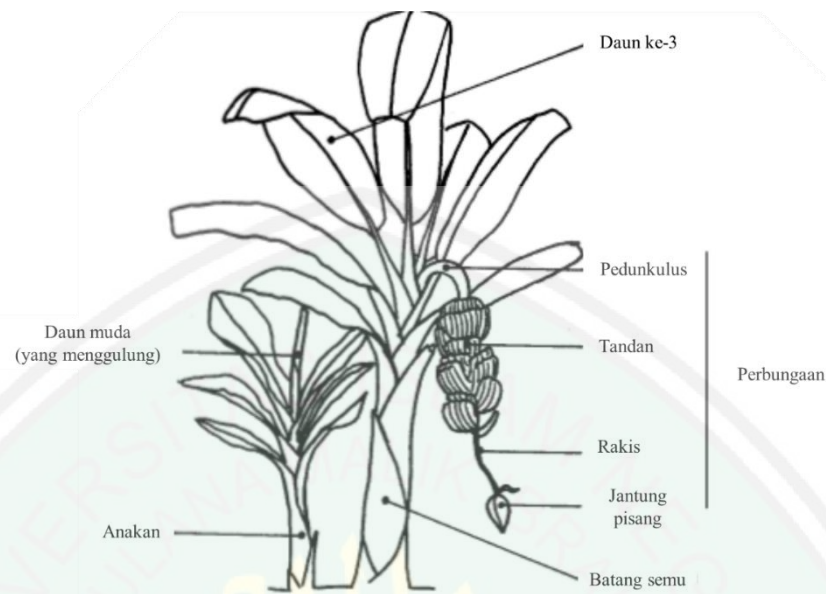
Secara ilmiah, tumbuhan pisang (genus *Musa*) tergolong dalam famili Musaceae bersama dengan genus *Ensete* dan *Musella*. Famili Musaceae

berkerabat dekat dengan Famili Heliconiaceae, Lowiaceae dan Strelitziaceae (Gambar 2.1) (Simpson, 2006).



Gambar 2.1 Cladogram Ordo Zingiberales dengan sifat apomorfi terpilih (Simpson, 1953)

Perawakan pohon pisang terdiri dari akar, batang, tangkai, daun, perbungaan dan anakan pisang (Gambar 2.2). Pisang (*Musa* sp) adalah tumbuhan herba besar dan berperawakan tinggi yang dapat mencapai 2-4 m (Gambar 2.2). Pisang memiliki perakaran adventif (Siemonsma dan Piluek, 1994) bertipe akar serabut, dan pertulangan yang berserat (Satuhu dan Supriyadi, 1999) sehingga pisang termasuk dalam kelas Liliopsida (Simpson, 1953). Akar utama tumbuhan pisang memiliki ketebalan 5–8 mm (Satuhu dan Supriyadi, 1999) dan dapat berkembang sepanjang 4-5 m secara lateral serta mampu menembus tanah hingga kedalaman 75 cm (Siemonsma dan Piluek, 1994).



Gambar 2.2 Perawakan Umum Tumbuhan Pisang (IPGRI,1996)

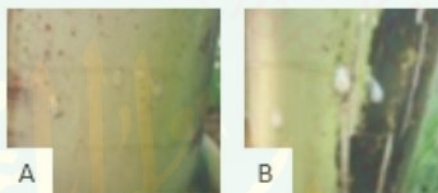
Batang utama pada tumbuhan pisang adalah rimpang yang berada di bawah tanah dan berukuran pendek, bertipe simpodial yang biasanya disebut bonggol (Espino *et al.*, 1992). Dari batang utama akan tumbuh pelepah-pelepah yang mengelompok membentuk batang semu (*pseudostem*) udara. Rongga udara pada *pseudostem* pisang inilah yang menyebabkan pisang termasuk dalam ordo Zingiberales (Simpson, 1953). *Pseudostem* pada pisang tumbuh mengelompok di dalam rumpun (Siemonsma dan Piluek, 1994) (Gambar 2.2).

Terdapat poros pada bagian tengah yang tersembunyi di bagian bawah *pseudostem*. Pada saat berbunga, maka bagian poros tersebut memanjang, menembus *pseudostem* dan menghasilkan perbungaan. Ada berbagai penampakan *pseudostem* dari tumbuhan pisang, diantaranya ramping (slender) dan besar (robust) (IPGRI, 1996). *Pseudostem* memiliki berbagai warna dari tiap spesies yaitu warna hijau, kekuningan, sampai merah keunguan (Gambar 2.3) dan pada

beberapa spesies memiliki lapisan lilin. *Pseudosteleum* juga mengeluarkan getah yang berwarna bening (Gambar 2.4a) atau putih susu (Gambar 2.4b) (IPGRI, 1996).

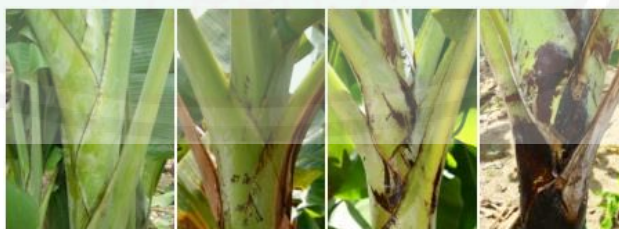


Gambar 2.3 Karakter berdasarkan warna *pseudosteleum* (dok. Pribadi)



Gambar 2.4 Karakter Warna Getah; A: Watery; B: Milky (Hapsari *et al.*, 2015)

Tangkai (*petiole*) daun pisang memiliki dua tipe yaitu; tipe *petiole* bersayap dan tipe *petiole* tidak bersayap. Banyak sedikitnya bercak dan warna bercak pada *petiole* juga dapat dijadikan karakter yang membedakan spesies pisang satu sama lain (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Bercak pada *petiole* Tumbuhan Pisang (dok. Pribadi)

Setiap daun tumbuhan pisang tersusun dari pelepah daun, *petiole* dan lamina (Rubatzky, 1998). Susunan daun berbentuk spiral, sehingga tumbuhan pisang tergolong dalam famili Musaceae dan menjadi pembeda dengan famili lain dalam

ordo Zingiberales (Simpson, 1953). Daun (*lamina*) pisang berbentuk lanset memanjang, mudah koyak, panjang daun sekitar 1,5-3 m, lebar daun sekitar 30-70 cm, dan memiliki permukaan bawah yang berkilin. Selain itu, *lamina* pisang memiliki tulang daun yang nampak nyata disertai tulang tengah penopang daun, (Rukmana, 1999). Daun pisang pada bagian *dorsal* memiliki warna hijau kekuningan hingga hijau tua dengan bercak merah keunguan, sedangkan warna daun pisang bagian *ventral* memiliki warna hijau kekuningan sampai merah keunguan (IPGRI, 1996).

Daun pisang yang paling muda masih menggulung dan berada dibagian tengah tanaman pisang. Daun muda akan tumbuh memanjang ke atas, kemudian membuka perlahan secara progresif. Adanya daun muda yang menggulung pada tanaman pisang ini yang menyebabkan pisang termasuk dalam ordo Zingiberales dan karakter inilah yang menjadi karakter khas dari ordo Zingiberales (Simpson, 1953). Daun pisang berbentuk *lamina* yang melebar dengan urat daun bertipe *pinnatus* membentuk paralel satu sama lain (Dasuki, 1991). Karakter daun semacam ini adalah salah satu sifat umum dari ordo Zingiberales (Simpson, 1953). Bagian pangkal dari daun pisang juga berbentuk bermacam-macam yaitu; bentuk pangkal daun meruncing disatu sisi dan membulat disisi lain (Gambar 2.6a), membulat di kedua sisi (Gambar 2.6b), atau meruncing di kedua sisi (Gambar 2.6c). Tepi daun pisang rata dengan ujung daun umumnya terbelah (IPGRI, 1996).



Gambar 2.6 Tipe Pangkal Daun Pisang: Ket: A:satu sisi meruncing dan sisi lainnya melengkung; B: kedua sisi melengkung; C: kedua sisi meruncing (dok.pribadi)

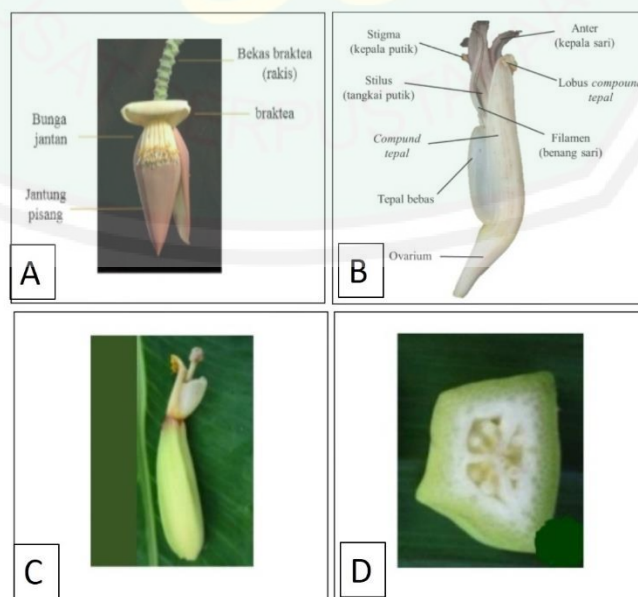
Bunga pada tumbuhan pisang merupakan tipe bunga majemuk (*inflorescence*). Perbungaan pada tumbuhan pisang ini berasal dari *rhizoma* yang berkembang dari bawah *pseudostem* membentuk bunga dan buah (Espino *et. al.*, 1992). Pada setiap bunga akan dibungkus oleh braktea yang bervariasi warna dan bentuknya (Gambar 2.7) (Dasuki, 1991). Keberadaan braktea tersebut berfungsi untuk melindungi bunga didalamnya (Simpson, 1953). Jika bunga telah membuka maka braktea akan terlepas dan jatuh ke tanah (Dasuki, 1991).



Gambar 2.7 Berbagai bentuk braktea pisang (Hapsari *et al.*, 2015)

Bunga pisang terdiri dari bunga jantan dan bunga betina. Bunga betina pada tumbuhan pisang akan berkembang menjadi buah secara normal, sedangkan bunga jantan yang berada di ujung tandan tidak berkembang dan tetap dilindungi

oleh braktea (Simpson, 1953). Posisi perbungaan yang terkulai menyebabkan posisinya terbalik sehingga bentukan ini biasa disebut jantung pisang (Gambar 2.8a) (Dasuki, 1991). Setiap bunga bersifat *epigius*, *zigomorf*, dan uniseksual. Bunga pada pisang tersusun atas sepal, tepal, compound tepal, stamen, pistillum dan ovarium. Bunga pisang memiliki 6 tepal dalam 2 lingkaran, tetapi 3 sepal dan 2 petal bersatu membentuk *compound tepal* sedangkan bagian adaksialnya lepas sehingga disebut tepal bebas (Gambar 2.8b) (Dasuki, 1991). Stamen bunga pisang biasanya berjumlah 5 atau 6 buah (Dasuki, 1991). *Pistillum* berujung pada 3 karpel dan membentuk *ovarium inferus* (Gambar 2.8c). Bakal buah pada tumbuhan pisang ini terletak di bagian bawah dasar bunga (*inferus*) sehingga inilah yang menjadi karakter dari anggota ordo Zingiberales (Simpson, 1953) (Gambar 2.8c). Ovula yang ada pada ovarium berjumlah banyak tiap ruang dengan *plasenta aksilaris*, satu *stilus*, dan 3 lobus pada *stigma* (Dasuki, 1991) (Gambar 2.8d).



Gambar 2.8 Penampakan organ generatif pada pisang (Hapsari *et al.*, 2015)

Buah berkembang dari bunga betina yang telah mekar. Periode perkembangan buah terjadi sekitar 3-4 bulan, sesuai dengan kondisi cuaca. Setelah buah dalam tandan tersebut terbentuk, maka tanaman induk akan mati (Augustburger *et al.*, 2001). Buah pisang tersusun dalam sebuah tandan (Dasuki, 1991). Buah pisang berbentuk memanjang, membengkok, dengan ujung meruncing atau membentuk leher botol, kemudian kulitnya berwarna hijau, kuning, atau coklat. Panjang buah pisang berkisar antara 10-18 cm dengan diameter sekitar 2,5-4,5 cm. Selain itu, buah pisang juga memiliki tekstur daging buah (*mesocarp*) yang tebal dan lunak dan memiliki berbagai macam rasa yaitu, rasa asam, sepat hingga manis (Dasuki, 1991). Kulit buah (*epicarp*) yang masih muda berwarna hijau, namun setelah tua (matang) akan berubah menjadi kuning (Cahyono, 2002).

Buah pisang ada yang berbiji atau tanpa biji. Biji pada buah pisang berbentuk kecil, bulat, dan berwarna hitam (Cahyono, 2002). Pada jenis pisang liar terdapat biji fertil pada daging buahnya (Gambar 2.9a dan f). Biji pisang liar memiliki testa yang keras, dengan endosperm serta perisperm yang beramilum (Dasuki, 1991), berwarna hitam atau coklat tua. Selain itu, biji pada pisang liar berbentuk bulat tidak beraturan, dapat juga berbentuk lensa, atau silindris (Nasution dan Yamada, 2001). Sedangkan tidak ada biji fertil pada pisang kultivar (Gambar 2.9b-e) (Rukmana, 1999). Buah pada pisang kultivar bersifat partenokarpi bakal biji akan mengalami keriput dan berubah menjadi bintik-bintik kecil berwarna coklat. Hal ini terjadi sebelum proses pembuahan. (Gambar 2.9c-e) (Espino *et al.*, 1992).



Gambar 2.9 Keberadaan biji pada pisang. Ket: a) Pisang Jantung Kuning (AAw), b) Pisang Trimulin (AA cv), c) Pisang Morosebo (AAA cv) , d) Pisang Triolin (AAB cv) , e) Pisang Saba Awu (ABB cv), f) Pisang Klutuk Ijo (BBw) (Hapsari *et al.*, 2015)

2.1.2 Pisang Raja

Pisang raja dan jenis pisang buah lainnya berasal dari hasil hibrida *M. acuminata* dan *M. balbisiana* yang memiliki kandungan gula yang tinggi dan mudah diserap oleh tubuh sehingga sering dikonsumsi sebagai buah pisang yang dapat langsung dimakan (Morton, 1987). Berikut ini beberapa ciri-ciri pisang raja pada umumnya (Suhardiman, 2004): (1) Dalam satu tandan umumnya terdapat 9 sisir atau sekitar 129 buah pisang (Gambar 2.10); (2) Buahnya berbentuk melengkung (Gambar 2.12a) dan berkulit agak tebal (3 mm) dengan ujung runcing bulat (Gambar 2.11); (3) Daging buah berwarna putih kekuningan (Gambar 2.12b), kuning muda atau kemerah merahan, tidak berbiji dan memiliki tingkatan rasa agak manis hingga manis.

Pisang Raja tergolong menjadi genom AAB dan ABB (Simmonds, 1996). Karakteristik umum dari pisang kelompok genom AAB (Raja Seribu, Raja Sereh, Raja Kisto, Raja Gareng, Raja Kutuk, dan Raja Lini) (Hapsari *et al.*, 2015), yaitu memiliki rumpun sedang hingga banyak, *pseudostem* cukup besar dan kokoh, berwarna hijau dengan sedikit bercak berwarna coklat hingga hitam, dan tinggi pohon dapat mencapai 5 m. Tepi tangkai daun pisangnya sedikit bersayap, dengan

daun berukuran panjang dan sedikit terkulai. Braktea berwarna merah kekuningan dan menggulung. Bunga jantan berwarna krem hingga kuning. Tandan buah berukuran sedang hingga besar, berorientasi membentuk sudut dengan sisir yang melingkar, berisi 5 – 10 sisir pisang. Buah berbentuk lurus hingga sedikit melengkung, dan berwarna kuning saat masak. Daging buah berwarna putih, krem hingga kuning dengan rasa manis dan sedikit masam. Pisang kultivar yang bergenom AAB umumnya sering dikonsumsi langsung sebagai buah segar.

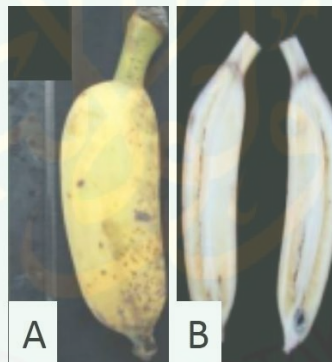
Pisang Raja yang bergenom ABB (Raja Bali dan Raja Brentel) memiliki karakteristik dominan yang menyerupai pisang *Musa balbisiana*, memiliki batang semu yang besar dan kokoh, berwarna hijau dengan sedikit atau tanpa bercak dan berlilin banyak, dan tidak terlalu tinggi mencapai $\pm 1,5$ m (Hapsari *et al.*, 2015). Tepi tangkai daun saling mengatup, dengan daunnya yang panjang dan berwarna hijau (Espino *et al.*, 1992). Braktea sedikit menggulung, bagian dalam berwarna merah, sangat menyirap dan berlilin banyak. Bunga jantan berwarna kuning bersemu merah. Beberapa kultivar unik memiliki buah tunggal (tidak bersisir) (Espino *et al.*, 1992). Pisang Raja berukuran sedang, berkulit tebal dan berwarna kuning pada saat masak. Pisang kultivar genom ABB dimanfaatkan sebagai pisang olahan, sehingga perlu dimasak terlebih dahulu sebelum dikonsumsi (Espino *et al.*, 1992).



Gambar 2.10 Perawakan tandan buah pisang raja (Hapsari *et al.*, 2015)



Gambar 2.11 Karakteristik buah pisang raja (Hapsari *et al.*, 2015)



Gambar 2.12 Penampakan buah pisang Raja.

Ket: (a) Penampakan kulit luar dan (b) warna daging pisang Raja (Hapsari *et al.*, 2015)

Ciri khas dan karakter dari pisang Raja di atas merupakan salah satu bukti nyata dari makna tersirat dalam firman Allah SWT al-Qur'an surat ar Rad (13):4 pada lafadz *وَنُفِصِّلُ بَعْضَهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأُكُلِ* yang artinya “Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya”. Maksudnya adalah adanya perbedaan dalam jenis buah-buahan dan tanaman itu dari segi bentuk, warna, rasa, daun dan bunganya kemudian ada juga yang

berubah rasanya dengan izin Allah SWT. Padahal semuanya berasal dari satu zat alam yang sama yaitu air, tetapi menghasilkan tumbuh-tumbuhan dan buah yang beraneka macam warna dan rasa yang tidak terhitung. Sesungguhnya dalam hal-hal seperti itu terdapat tanda-tanda kebesaran Allah SWT bagi orang yang menyadarinya (Katsir, 2004).

Dilanjutkan dengan lafadz *إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ* yang artinya “*Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berpikir* “. Tanda-tanda yang sangat besar itu menunjukkan bahwa Allah SWT bebas berbuat dengan kekuasaan-Nya sehingga dapat membuat sesuatu yang beranekaragam dan menjadikannya sesuai dengan keinginan-Nya (Katsir, 2004).

2.1.3 Syarat Tumbuh Tanaman Pisang

Tanah yang mengandung humus, kapur dan tanah berat akan lebih mudah ditumbuhi oleh pohon pisang. Bahkan tumbuhan pisang akan tumbuh dengan baik di daerah-daerah tropis yang basah dan beriklim lembab serta panas yang merata (Nasution dan Yamada, 2001). Suhu optimum untuk pertumbuhan pisang adalah sekitar 27 °C dan suhu maksimumnya 38 °C. Indonesia menjadi sentra penghasil pisang karena iklim Indonesia cocok untuk pertumbuhan tanaman pisang. Walau demikian, tidak semua wilayah di Indonesia merupakan sentra produksi tanaman pisang. Selain iklim yang sesuai, budidaya yang dilakukan oleh masyarakat di daerah juga yang menjadi penentu keberadaan sentra tanaman pisang (Nasution dan Yamada, 2001).

Di wilayah Indonesia, tumbuhan pisang dapat tumbuh liar dan ditanam hingga ketinggian 2000 mdpl dengan curah hujan yang cukup. Tumbuhan pisang yang

ada di alam, umumnya ditemukan di sepanjang sungai yang tanahnya lembab, terbuka dan tidak berangin (Nasution dan Yamada, 2001). Penanaman pisang pada tanah datar dengan derajat keasaman tanah sekitar pH 4.5 – 7.5 akan menghasilkan produktivitas yang optimal (Cahyono, 1996).

2.1.4 Persebaran Pisang

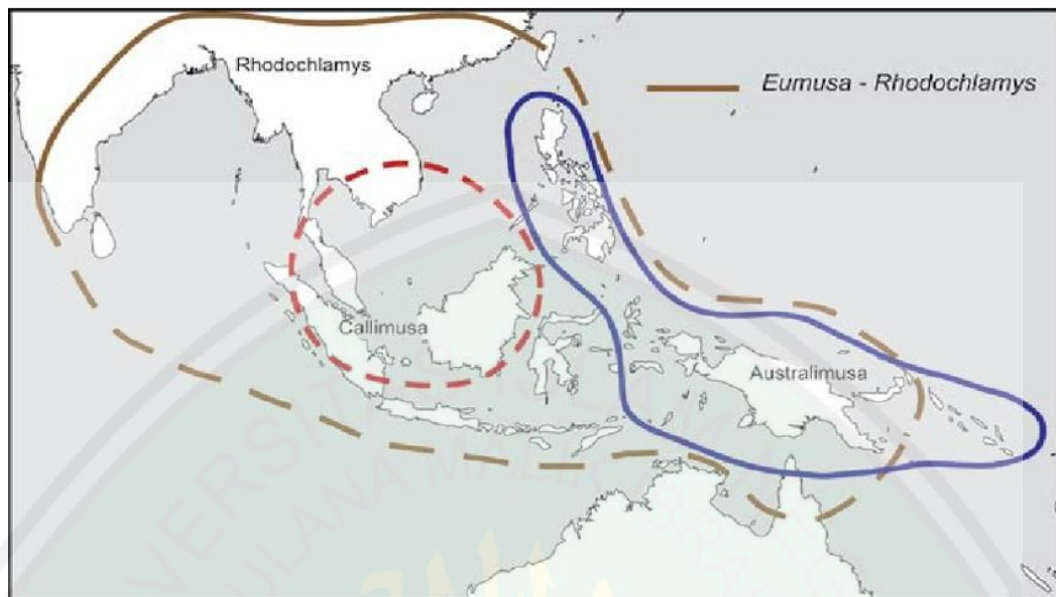
Tiga genera Musaceae tersebar di wilayah Asia dan Afrika tropis, walaupun bukti menunjukkan keberadaan fosil yang telah ditemukan sementara berada di wilayah Amerika Utara dan Afrika. Sementara itu, tiga genera Strelitziaceae ditemukan di wilayah Madagaskar, Afrika bagian selatan dan Cekungan Amazon. Sedangkan Lowiaceae terdistribusi di wilayah Asia Tenggara. Heliconiaceae adalah anggota terbesar dari Zingiberales yang tersebar di wilayah Pasifik dari Samoa hingga ke Sulawesi.

Menurut ahli botani, tanaman pisang umumnya berasal dari daerah India, Filipina dan semenanjung Malaya (Rukmana, 1999). Penyebaran tanaman pisang ke berbagai wilayah dimulai tahun 1000 SM ke wilayah timur melalui Samudera Pasifik dan Hawaii sedangkan penyebaran di wilayah barat melalui Samudera Hindia, Afrika hingga pantai timur Amerika. Pada tahun 650 M, pahlawan-pahlawan Islam di negara Arab telah menyebarkan tanaman pisang di sekitar laut tengah (Rukmana, 1999). Wilayah Indo-Malesia merupakan pusat keragaman pisang, kemudian menyebar hingga ke seluruh wilayah tropis dan subtropis di Asia, Amerika, Afrika dan Australia (Simmonds dan Shepherd, 1955; De Langhe *et al.*, 2009).

Namun adapula yang menyatakan bahwa pisang liar *Musa acuminata* berasal dari daerah tropis di negara-negara Asia seperti Indonesia, Filipina, Australia, dan Afrika Timur (de Langhe *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013). Bukti arkeologi dan paleontologi menunjukkan bahwa pisang *Musa acuminata* tersebar luas di Asia Tenggara, dan mulai dibudidaya setidaknya mulai tahun 5.000 SM (De Langhe *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013). Terdapat kurang lebih 65 spesies dari genus *Musa* yang sebagian besar tersebar di wilayah Asia dan Pasifik (Liu *et al.*, 2010).

Pisang Raja merupakan pisang hasil hibrida pertama dari *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (Rukmana, 1999). Mulai saat itulah, budidaya pisang terus berkembang dan menjadi salah satu sumber makanan penting di wilayah Asia Tenggara, Afrika, dan Oceania, hingga pisang-pisang pun diekspor ke wilayah Amerika Tengah dan Selatan (Rukmana, 1999).

Berdasarkan banyaknya kromosom, maka genus *Musa* terbagi dalam empat *section* (Chessman, 1947) antara lain *Australimusa* dan *Callimusa* (10 kromosom), *Eumusa* dan *Rhodochlamys* (11 kromosom). *Section Eumusa* tersebar di seluruh wilayah Asia Timur, kecuali Melanesia bagian timur. Anggota *section Rhodochlamys* tersebar di sekitar dataran iklim basah di Asia bagian selatan (De Lange, 2009). Anggota *section Australimusa* tersebar dari selatan hingga Indonesia bagian timur dan Filipina bagian selatan ke Melanesia dan *section Calimusa* tersebar di Vietnam bagian selatan, Malaysia, Borneo dan Sumatra. *Section* yang baru ditambahkan oleh George Agent tahun 1976 memiliki 7 kromosom yakni *Ingetimusa* (Argent, 1976) (Gambar 2.13).



Gambar 2.13 Titik persebaran *section Musa* (De Lange, 2009)

2.2 Variasi Genetik

Salah satu terjadinya variasi genetik pada tumbuhan dapat diakibatkan oleh proses meiosis dan mutasi. Dalam proses meiosis kemungkinan adanya segregasi acak yang mengakibatkan terjadi rekombinasi gen. Namun, proses meiosis hanya dapat mengakibatkan variasi di dalam populasi atau jenis organisme sedangkan mutasi adalah perubahan genetik akibat penyimpangan pada proses pewarisan sifat dan menjadi sumber keragaman baru dalam populasi tumbuhan (Rimbawanto, 2008).

Penyebab lain adanya variasi genetik adalah hibridisasi (kawin silang dengan 2 sifat beda). Pada setiap generasi akan terjadi rekombinasi gen sehingga *genotipe* baru akan muncul. Umumnya, keturunan berdasarkan *genotipe* mewarisi separuh gen dari induk betina dan separuh gen induk jantan, maka susunan genetiknya pun dapat berbeda dengan kedua induknya atau dengan individu lain yang masih dalam satu populasi (Indrawan, 2007).

Perlunya pemahaman tentang keragaman genetik suatu jenis tumbuhan akan menjadi unsur utama dalam memanfaatkan sumber genetik tumbuhan. Keragaman genetik adalah modal dasar bagi suatu jenis tumbuhan untuk tumbuh, berkembang dan bertahan hidup dari generasi ke generasi. Begitupula kemampuan tumbuhan beradaptasi dengan perubahan lingkungan tempat tumbuh juga ditentukan oleh potensi keragaman genetik yang dimiliki. Semakin tinggi keragamannya semakin besar peluang tumbuhan untuk beradaptasi dengan lingkungannya (Finkeldey, 2007).

Kawasan Asia Tenggara menjadi daerah asal sumber genetik (plasma nutfah) pisang. Berdasarkan hasil ekspedisi seorang ahli botani Rusia (Nikolai Ivanovich Vavilov) disimpulkan bahwa cakupan daerah penghasil pisang adalah Indo-Cina, Malaysia, Filipina dan Indonesia (Daniel *et al*, 2001).

2.3 Filogenetik dan Evolusi

Analisis sistematika evolusi dapat dilakukan berdasarkan pada kemiripan karakter individu yang dimiliki dengan merekonstruksi sejarah evolusi dan hubungannya antara keturunan dengan nenek moyangnya (Stuessy, 1989). Analisis yang sering digunakan adalah analisis filogenetika atau kladistik. Analisis kladistik mempunyai arti kata *clade* yang berarti kelompok keturunan dari satu nenek moyang yang sama (Brinkman dan Leipe, 2001).

Filogenetik adalah salah satu metode yang paling sering digunakan dalam sistematika untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan agar dapat memahami keanekaragaman makhluk hidup melalui pohon filogenetik. Pohon filogenetik ini

digunakan untuk menggambarkan hubungan kekerabatan antar taksa yang terdiri dari sejumlah nodus dan cabang dengan hanya satu cabang yang menghubungkan dua nodus paling berdekatan. Setiap nodus mewakili unit-unit taksonomi dan setiap cabang mewakili hubungan antar unit dan menggambarkan hubungan antara keturunan dengan leluhur. Pola percabangan yang terbentuk dari suatu pohon filogenetik disebut topologi (Li dan Graur, 1991). Analisis filogenetik tidak terlepas dari evolusi biologis yang mempelajari variasi dan perbedaan genetik antar populasi, sedangkan jarak genetik dapat diketahui berdasarkan perbedaan basa polimorfik dari masing-masing urutan DNA (Cavalli, 1997).

Evolusi adalah tahapan proses suatu organisme menjadi lebih kompleks melalui akumulasi perubahan dari beberapa generasi sebelumnya. Suatu keturunan pasti mempunyai beberapa sifat yang berbeda dari nenek moyangnya (Estabrook, 1984). Proses evolusi juga melibatkan mutasi genetik dan rekombinan dalam spesies untuk menghasilkan spesies baru. Sejarah evolusi organisme dapat diidentifikasi dari perubahan karakternya. Similaritas sifat yang dimiliki adalah dasar untuk menganalisis hubungan antara satu spesies dengan spesies lainnya (Hidayat dan Pancoro, 2008).

Analisa filogenetik dengan molekuler akhir-akhir ini sering digunakan pada penelitian tumbuhan. Adanya kombinasi teknik biologi molekuler dengan statistik digunakan untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan organisme. Dasar pemikiran penggunaan sekuen DNA dalam studi filogenetik ini karena perubahan basa nukleotida terjadi berdasarkan waktu. Maka dari itu, sekuen DNA dapat digunakan untuk memperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi. Penggunaan sekuen DNA

telah menarik perhatian para praktisi taksonomi dunia, untuk menjadikan sekuen DNA ini sebagai karakter dalam penelitian filogenetik. Hal ini dikarenakan sekuen DNA menawarkan data yang lebih akurat melalui pengujian homologi terhadap karakter-karakter yang ada pada suatu organisme (Baldwin *et al.*, 1995).

2.4 Filogeografi

Biogeografi adalah studi tentang pola dan penyebab distribusi makhluk hidup di muka bumi. Berbagai pendekatan digunakan untuk menjawab pertanyaan biogeografi, termasuk biogeografi historis, biogeografi ekologis dan *phylogeography*. Faktor historis utama yang mempengaruhi distribusi saat ini meliputi *vicariance* dan *spreadal*. *Vicariance* adalah pemisahan distribusi, contohnya ketika daratan kuno terbelah dan terpisah karena pergeseran benua, atau ketika pegunungan membentang dengan populasi rendah (Avice, 2000).

Filogeografi adalah studi tentang struktur genetik dan geografis populasi atau spesies (Avice, 2000). Istilah “filogeografi” diperkenalkan untuk menggambarkan sinyal genetik yang terstruktur secara geografis di dalam dan diantara spesies (Knowles, 2002). Filogeografi umumnya menggunakan informasi genetik untuk meneliti sejarah dan pola silsilah dalam spesies dan populasi. Informasi ini digunakan untuk menyimpulkan hubungan antara daerah biogeografi dan sejarah spesies. Penanda genetik yang digunakan, seperti urutan DNA mitokondria atau kloroplas seringkali hanya diwariskan secara *uniparent*. Dengan adanya hubungan antara kajian filogenetik dan biogeografi maka filogeografi dapat digunakan untuk melacak sejarah silsilah secara lengkap (Knowles, 2002).

2.5 Pendekatan Molekuler

Pendekatan molekuler (marka genetik) merupakan suatu metode penunjuk keberadaan rangkaian nukleotida (DNA atau RNA) dan protein yang dapat menyandikan suatu sifat sehingga dapat memberikan informasi tentang keberadaan posisi suatu sekuen di dalam genom (Brown, 1996).

Marka genetik dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu individu atau genotip, derajat kekerabatan antar genotip, dan adanya variasi genetik pada suatu populasi tanaman (Brown, 1996). Penanda genetik berdasarkan DNA juga dapat menentukan gen atau kompleks gen yang diinginkan dalam suatu genotip spesifik, untuk pengembangan varietas tanaman baru melalui transformasi (Brown, 1996).

Berbagai marka genetik yang telah dikembangkan untuk penelitian terhadap tumbuhan antara lain adalah RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Nwakanma, 2003; Ekasari *et al.*, 2013; Hapsari *et al.*, 2015), DAF (*DNA Amplified Fingerprinting*) (Pertiwi, 2013), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Pillay *et al.*, 2000; Sukartini, 2008; Wijayanto, 2013), AFLP (*Amplification Fragment Length Polymorphism*) (Makful, 2010) dan marka yang akhir-akhir ini sering digunakan yaitu marka berdasarkan sekuen spesifik DNA diantaranya ITS (Li Lin-Feng, 2010; Liu, 2010), *rbcl* (Handique *et al.*, 2013) dan *trn-L* (Retnoningsih *et al.*, 2014), *MatK* (Davey *et al.*, 2013) dan *atpB* (Lamare, 2016).

2.6 ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

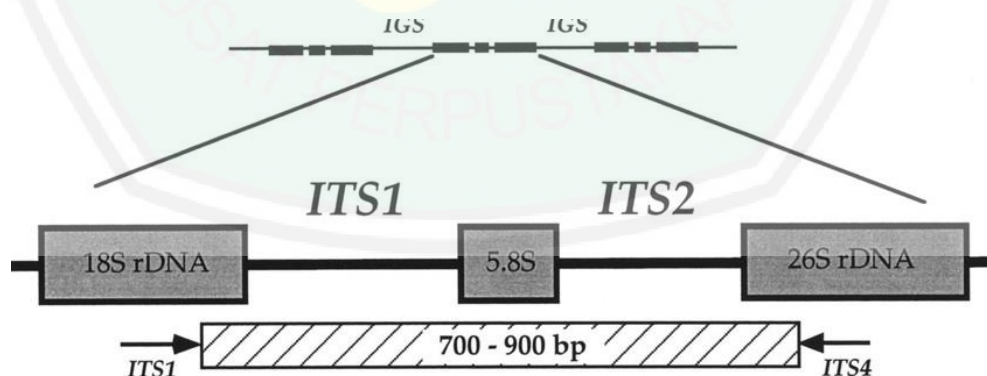
Internal Transcribed Spacer (ITS) adalah genom nuklear atau DNA ribosomal (rDNA) (McCullough *et al.*, 1998). ITS merupakan penanda pada DNA yang bersifat universal dan mampu teramplifikasi pada semua organisme namun tidak pada golongan vertebrata (McCullough *et al.*, 1998). ITS merupakan bagian rDNA yang sering digunakan sebagai pembanding tingkat genus dan spesies dalam bidang evolusi (McCullough *et al.*, 1998). Selain itu, ITS juga digunakan untuk memahami keanekaragaman dan menjawab beberapa masalah filogenetika pada tumbuhan (McCullough *et al.*, 1998; Gouja, 2014; Hapsari *et al.*, 2015; Janssens *et al.*, 2017)..

ITS terletak diantara gen pengkode rDNA yang bersifat *conserve* yaitu 18S, 5,8S dan 26S (Gambar 2.14) (Soltis dan Soltis, 1998). ITS terdiri dari ITS 1 dan ITS 2. ITS 1 terletak diantara gen 18S dan 5,8S sedangkan ITS 2 berada diantara gen 5,8S dan 26S (Gambar 2.14). ITS 1 dan ITS 2 memiliki panjang sekitar 700-900 bp (Gambar 2.14) (Shaw *et al.*, 2000). Primer ITS L dapat mengamplifikasi daerah ITS 1 sedangkan primer ITS 4 mengamplifikasi daerah ITS 2 (Osterbauer dan Rehms, 2002). Daerah pada gen 5,8S mempunyai panjang total 2600 bp sedangkan gen 26S memiliki panjang 3300 bp (Osterbauer dan Rehms, 2002). Daerah-daerah tersebutlah yang memiliki tingkat *conserve* yang tinggi (Koch *et al.*, 2008).

Seringnya penggunaan ITS dibuktikan dengan angka publikasi sekuen ITS yang meningkat tiga kali lipat semenjak tahun 2003 (Koch *et al.*, 2008). Hal ini terjadi karena ITS memiliki beberapa kelebihan yakni memiliki tingkat

penggandaan yang tinggi daripada keturunan induk betina (Muir *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2008) dan memiliki derajat konservasi pada setiap komponennya (Darmono, 1996). Karakteristik unggul yang dimiliki ITS adalah ukurannya yang kecil (± 700 bp) (Shaw *et al.*, 2000) (Gambar 2.14) dan memiliki salinan yang banyak di dalam genom inti sehingga daerah ITS mudah untuk diisolasi, diamplifikasi, dan dianalisis (Hidayat *et al.*, 2008).

Bahkan penggunaan ITS ini dapat memberikan informasi keanekaragaman genetik dan meninjau ulang kembali klasifikasi genom pisang kultivar yang sebelumnya telah dilakukan berdasarkan penanda mikrosatelit (Retnoningsih *et al.*, 2009). Tidak hanya itu, daerah ITS juga cocok digunakan sebagai kandidat DNA barcode karena sekuen dari ITS berpotensi untuk penanda filogenetik dan secara luas digunakan untuk rekonstruksi filogenetik pada tingkat genus dan spesies (Chen, 2010).



Gambar 2.14 Gambaran Letak daerah ITS (Shaw *et al.*, 2000)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah penelitian deskriptif eksploratif kualitatif. Objek dalam penelitian ini adalah sampel daun pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta sebagai *in-group* dan ditambahkan 2 sampel daun pisang masing-masing *Musa acuminata* dan *Musa balbisiana* yang digunakan sebagai *out-group*.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2017 hingga Juni 2018. Pengambilan sampel dilakukan di Kebun Plasma Nutfah Pisang, Dinas Pertanian dan Pangan Giwangsan Kota Yogyakarta, sedangkan pengambilan data dan analisis dilakukan di Laboratorium Genetika dan Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, pelindung diri (*handgloves*, masker, jas laboratorium), *mini box*, gunting, plastik klip, kertas label, neraca analitik, gelas kimia berukuran 250-500 mL, gelas ukur (100-500 mL), labu *erlenmeyer* (100 mL dan 250 mL), *microwave*, *vortex*, tabung *ependorf* (0,5 mL dan 1.5 mL), mortar, *pestle*, lemari pendingin, rak *tube*, *water*

bath, mikropipet (5-10 μL , 2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL), (*blue, yellow, white*) *tip*, sentrifuge HIRAEUS Pico17, spatula, cetakan agar, perangkat elektroforesis BIO-RAD, Molecular Imager® Gel Doc XR System BIO-RAD, AE-200 Nano Nucleic Acid Analyzer, dan MyCycler Thermal Cycler BIO-RAD.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, silika gel, The Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega (*Cell Lysis Solution, Nuclei Lysis Solution, Protein Precipitation Solution, DNA Rehydration Solution, dan RNase A Solution*), isopropanol, ethanol 70%, *tissue*, serbuk *agarose*, Tris-Boric EDTA (TBE), *loading dye*, ddH₂O, *Ethidium Bromide* (EtBr), alkohol 70%, HF Buffer, primer ITS L (*forward*), primer ITS 4 (*reverse*), aquades, *aluminium foil*, 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific GeneRuler, dan Intron Biotechnology PCR Master Mix.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sampel DNA

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda menggulung yang masih utuh dari pisang Raja yang diambil dari kebun Plasma Nutfah Pisang, Dinas Pertanian dan Pangan, Kota Yogyakarta (Tabel 3.1 dan 3.2). Sampel daun yang telah diambil kemudian dimasukkan kedalam plastik klip yang di dalamnya terdapat *silica gel*.

Tabel 3.1 Kode, Nama lokal dan asal daerah koleksi pisang Kebun Plasma Nutfah Giwangan Yogyakarta yang digunakan.

Kode	Nama Lokal Pisang	Nama Latin / Ilmiah
R1	Raja Delima	<i>Musa acuminata</i> AAA cv Raja Delima
R2	Raja Sereh	<i>Musa acuminata</i> AAB cv Raja Sereh
R3	Raja Kisto	<i>Musa acuminata</i> AAB cv Raja Kisto
R4	Raja Bali	<i>Musa balbisiana</i> ABB cv Raja Bali
R5	Raja Gareng	<i>Musa acuminata</i> AAB cv Raja Gareng
R6	Raja Seribu	<i>Musa acuminata</i> AAB cv Raja Seribu
R7	Raja Kutuk	<i>Musa acuminata</i> AAB cv Raja Kutuk
R8	Raja Brentel	<i>Musa balbisiana</i> ABB cv Raja Brentel
R9	Raja Lini	<i>Musa acuminata</i> AAB cv Raja Lini
AA	<i>Musa acuminata</i>	Out-group
BB	<i>Musa balbisiana</i>	Out-group

Tabel 3.2 Kode, asal daerah dan kondisi geografi wilayah asal pisang yang digunakan..

Kode	Asal Daerah	Kondisi iklim dan Geografis
R1	Kabupaten Malang, Jawa Timur	Rata-rata kelembaban tinggi 90.74 %, suhu rata-rata 26.1 – 28.3 °C dan curah hujan rata-rata berkisar antara 1.800 – 3.000 mm per tahun (Pemkab Malang, 2017)
R2 dan R7	Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah	Suhu rata-rata 200C – 320C. Sedangkan kelembaban rata-rata antara 70 – 90% dengan curah hujan tertinggi pada bulan Desember sebesar 9.291 mm (Pemkab Purworejo, 2017)
R3	Tanjung Klatak, Banyuwangi, Jawa Timur	Curah hujan rata-rata sepanjang tahun 2000 mm. Wilayah DKI Jakarta termasuk daerah tropis beriklim panas dengan suhu rata-rata per tahun 27 °C dengan kelembaban antara 80 sampai 90. Temperatur tahunan maksimum 32 °C dan minimum 22 °C (Pemkab Banyuwangi, 2017).
R4	Kabupaten Bantul, Jawa Tengah	Curah hujan tergolong sedang, dominan tanah regosol pada daratan Bantul (Pemkab Bantu, 2017)
R5	Tembarak, Temanggung, Jawa Tengah	Sebagian besar wilayah Kabupaten Temanggung merupakan dataran tinggi dan pegunungan, yakni bagian dari rangkaian Dataran Tinggi Dieng. Di

		perbatasan dengan Kabupaten Wonosobo terdapat Gunung Sindoro dan Gunung Sumbing (Pembab Temanggung, 2017)
R6	Jl.Cendana DKI Jakarta	Curah hujan rata-rata sepanjang tahun 2000 mm. Wilayah DKI Jakarta termasuk daerah tropis beriklim panas dengan suhu rata-rata per tahun 27 °C dengan kelembaban antara 80 sampai 90 . Temperatur tahunan maksimum 32 °C dan minimum 22 °C. Kecepatan angin rata-rata 11,2 km/jam (Pembab DKI Jakarta, 2017).
R8	Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah	Curah hujan tahunan rata-rata sebesar 2.790 mm, suhu udara berkisar antara 230 C sampai dengan 340 C, dengan kelembaban udara tahunan rata-rata 77%. (Pembab Sukoharjo, 2017).
R9	Kabupaten Gunung Kidul, Jawa Tengah	Wilayah Kabupaten Gunung kidul termasuk daerah beriklim tropis, dengan topografi wilayah yang didominasi dengan daerah kawasan perbukitan karst. Wilayah Kabupaten Gunung kidul sebelah utara memiliki curah hujan paling tinggi. Suhu udara rata-rata harian 27,7 °C, suhu minimum 23,2 °C dan suhu maksimum 32,4°C. Kelembaban nisbi berkisar antara 80 % – 85 %, tidak terlalu dipengaruhi oleh tinggi tempat, tetapi lebih dipengaruhi oleh musim (Pembab Gunung Kidul, 2017).

3.4.2 Ekstraksi DNA

Total DNA daun pisang Raja diekstraksi dengan menggunakan *The Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega*. Daun pisang yang masih muda dibekukan dengan direndam pada nitrogen cair kemudian dihancurkan dengan mortar dan *pestle* hingga menjadi serbuk. Sebanyak 40 mg serbuk daun pisang diambil dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 mL lalu ditambahkan 600 µL larutan *Nuclei Lysis* dan divortex selama 1-5 detik. Selanjutnya, suspensi diinkubasi pada suhu 65 °C selama 15 menit. Setelah diinkubasi, suspensi dicampurkan dengan 3

μL larutan RNase kemudian tube dibolak-balik sebanyak 2-5 kali agar suspensi tercampur rata. Langkah selanjutnya, tube yang berisi suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, setelah itu suspensi didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit.

Tahap berikutnya adalah presipitasi protein pada suspensi DNA dengan menambahkan $200\ \mu\text{L}$ *Protein Precipitation Solution* pada tube kemudian divortex selama 20 detik. Suspensi DNA dalam tube dipisahkan berdasarkan berat molekulnya dengan menggunakan *sentrifuge* pada kecepatan berkisar $13.000\text{--}16.000 \times g$ selama 30 menit kemudian diambil bagian *supernatant* dalam tube dengan hati-hati lalu supernatant dipindahkan ke tube baru yang berukuran $1,5\ \text{mL}$ dan ditambahkan lagi dengan $600\ \mu\text{L}$ Isopropanol. DNA yang telah ditambahkan isopropanol kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik dengan perlahan. Kemudian, campuran tersebut dipisahkan dengan menggunakan sentrifuge pada kisaran $13.000\text{--}16.000 \times g$ selama 1 menit dalam suhu ruang.

Tahap selanjutnya adalah purifikasi DNA. Campuran yang telah disentrifugasi kemudian dibuang bagian *supernatant*-nya lalu bagian *pellet* ditambahkan dengan $600\ \mu\text{L}$ ethanol 70% (suhu ruang). Larutan dalam tube dibolak-balik perlahan selama beberapa kali yang bertujuan untuk mencuci DNA sampel. Setelah itu, larutan dipisahkan lagi dengan menggunakan sentrifuge pada kecepatan berkisar $13.000\text{--}16.000 \times g$ selama 1 menit pada suhu ruang. Kemudian, *supernatant* diambil dengan menggunakan mikropipet (pada tahap ini *pellet* DNA mudah lepas sehingga harus dilakukan dengan sangat hati-hati). Selanjutnya, *pellet* DNA dikering-anginkan selama 15 menit lalu ditambahkan $100\ \mu\text{L}$ DNA Rehydration

Solution dan dihomogenkan dengan cara mengetuk *tube* beberapa kali. Tahap yang terakhir yaitu larutan DNA diinkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam. Kemudian DNA disimpan pada suhu 2-8 °C di lemari pendingin untuk waktu penggunaan yang lama.

3.4.3 Analisa Kualitatif dan Kuantitatif DNA

Analisa kuantitatif DNA bertujuan untuk mengetahui banyaknya konsentrasi DNA hasil ekstraksi dengan cara mengukur kemurnian DNA berdasarkan kemampuannya untuk mengabsorpsi sinar atau cahaya monokromatik. Analisa kuantitatif DNA dilakukan dengan mengambil masing-masing hasil ekstraksi dari sampel daun pisang Raja sebanyak 1 µL. Kemudian masing-masing sampel tersebut dianalisa dengan menggunakan absorbansi cahaya pada panjang gelombang A260 nm dan A280 nm dengan AE-200 *Nano Nucleic Acid Analyzer* (Nwakanma, 2003b). Tingkat kemurnian DNA dikatakan baik, jika nilai rasio *Optical Density* (OD) 260/280 nm yang diperoleh antara 1.8-2.0 (Sambrook *et al.*, 2001). Nwakanma (2003) menyatakan rasio OD 260/280 nm 1.8 mengindikasikan DNA murni, sedangkan rasio OD 260/280 nm kurang dari 1.8 kemungkinan DNA terkontaminasi protein. Menurut Fatchiyah *et al* (2009) tingkat kemurnian di atas 2,0 menunjukkan bahwa DNA tidak murni disebabkan juga oleh adanya sisa-sisa *etanol* pada saat pengeringan yang tidak sempurna atau adanya sisa kandungan metabolit sekunder pada organ tanaman yang diekstrak.

Analisis kualitatif DNA dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA hasil ekstraksi. Analisis hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Elektroforesis diawali dengan tahap pembuatan gel agarosa 1% yang

dilakukan dengan cara menimbang serbuk agarosa sebanyak 200 mg kemudian dilarutkan dalam 20 mL TBE 0.5x lalu dimasukkan ke dalam gelas beaker 100 mL dan dipanaskan di dalam *microwave* hingga larutan homogen dan berwarna bening. Setelah serbuk *agarose* larut dengan sempurna, larutan agarosa didinginkan sampai suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ kemudian ditambahkan sebanyak 1 μL *Ethidium Bromide* (EtBr) 100% ke dalamnya lalu dihomogenkan kembali. Kemudian, larutan *agarose* dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir (*comb*) (pastikan cetakan bersih dan berada pada posisi rata). Larutan agarosa dalam cetakan didiamkan selama ± 30 menit sampai menjadi padat dan mengeras. Gel agarosa yang telah mengeras diangkat dan dimasukkan ke dalam tank elektroforesis lalu ditambahkan buffer TBE 0.5x hingga gel terendam.

Sampel DNA hasil ekstraksi diambil masing-masing sebanyak 2 μL dan dicampur dengan 1 μL *loading dye* dengan menggunakan mikropipet di atas *aluminium foil*. Campuran DNA dan *loading dye* tersebut dimasukkan masing-masing ke dalam sumur (*well*) gel elektroforesis dengan menggunakan mikropipet. Sebanyak 2 μL DNA *Ladder Thermo Scientific Gene Ruler* 100 bp dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis sebagai penanda dan acuan untuk ukuran pita DNA sampel. Selanjutnya, elektroforesis diberi tegangan 100 V selama 25 menit. Setelah elektroforesis selesai, gel agarose dikeluarkan dari alat elektroforesis kemudian gel direndam dalam larutan EtBr selama 20 menit. Visualisasi gel hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *Molecular Imager® Gel Doc XR System* BIO-RAD.

3.4.4 Amplifikasi dan Sequencing Daerah ITS

Amplifikasi daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dilakukan dengan menggunakan primer ITS-L (TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG) (Hsiao *et al.*, 1994) *forward* dan ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) *reverse* (Biotechnology, Surrey, UK) dengan konsentrasi primer *forward* maupun *reverse* adalah 10 pmol/ μ L (Nugroho ED dan Dwi AR, 2016). Amplifikasi daerah ITS dilakukan dengan total volume sebanyak 30 μ L yang mengandung 3 μ L sampel DNA, 6 μ L ddH₂O, 6 μ L (*primer forward+reverse*), dan 15 μ L PCR mix. *Tube* berisi campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan *spindown* agar larutan tercampur rata dan menghilangkan gelembung yang ada pada *tube*. Reaksi PCR dilakukan dengan suhu *pre-denaturasi* 95 °C selama 3 menit, *denaturasi* 95 °C selama 30 detik, *annealing* 53 °C selama 30 detik, *elongasi* 72 °C selama 1 menit, dan *post-elongasi* 72 °C selama 7 menit. Tahap denaturasi hingga *elongasi* diulang sebanyak 35 siklus dengan menggunakan *My Cyclyer Thermal Cyclyer BIO-RAD*. Hasil amplifikasi divisualisasi dengan uji elektroforesis gel *agarose* 1 %.

Langkah selanjutnya adalah *sequencing* yang bertujuan untuk mengetahui urutan DNA sampel. Sekuensing DNA pisang Raja pada daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dilakukan pada sampel DNA hasil amplifikasi PCR yang dipurifikasi kemudian ditambahkan ddH₂O. Proses *sequencing* DNA pisang Raja dilakukan dengan menggunakan jasa *sequencing* perusahaan Biologi Molekuler ABI PRISM® 310 *Genetic Analyzer* di Singapore.

3.5 Analisis Data

3.5.1 Analisis Sekuen dan Variasi Genetik

Sekuen daerah ITS hasil *sequencing* dibaca dan dianalisis menggunakan software *Sequence Scanner* versi 1.0. Analisis hasil *sequencing* yang dilakukan meliputi panjang sekuen dan persentase nilai QV20+. Selanjutnya sekuen daerah ITS disejajarkan (*alignment*) menggunakan software Clustal X2 (Larkin *et al.*, 2007) dengan *default parameter* lalu disimpan dalam format FASTA dan NEXUS. Pensejajaran (*alignment*) sekuen daerah ITS diteliti untuk mengetahui tingkat *conserve* sekuen dan mencari variasi genetik dari perubahan basa nukleotida atau *gap* yang terjadi karena mutasi pada sekuen dari DNA hasil *sequencing*. Analisis variasi genetik dilakukan dengan menggunakan program DNASP 5.0 untuk mengetahui *conserved region*, jumlah mutasi insersi-delesi serta *polymorphism site*, *variable site* dan komposisi basa (G-C *contain*).

3.5.2 Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik atau kekerabatan menggunakan metode *Maximum parsimony* (MP), *Neighbor joining* (NJ), *Maximum likelihood* (ML) dan *Bayesian* yang dilakukan dengan program MEGA 5.0. Metode NJ menggunakan matriks *distance* sedangkan metode MP dan ML dan Bayesian menggunakan *character based* (Hall, 1942). Berdasarkan metode rekonstruksi pohon, metode NJ menggunakan pendekatan *clustering algorithm* yang menghasilkan satu pohon final sedangkan metode MP dan ML menggunakan pendekatan *optimality search criterion* yang menekankan pada evaluasi seluruh kandidat pohon dalam penentuan pohon terbaik menurut kriteria masing-masing metode (Zvelebil dan

Jeremy, 2008). Model terbaik untuk substitusi pohon filogenetik metode MP, NJ dan ML adalah model T92+G (Tamura 3-parameter + Gamma). Penentuan model terbaik T92+G ini berdasarkan nilai BIC yang paling rendah diantara lainnya (Tamura dan Nei, 1993; Tamura *et al.*, 2011).

Sementara itu, penggunaan metode *bayesian* diawali dengan penentuan model substitusi pohon filogenetik terbaik menggunakan jModelTest versi 2.1.10 (Posada, 2008) dengan berbagai macam uji diantaranya adalah *compute Likelihood Scores*, AIC (*Akaike Information Citerion*) dengan dan tanpa correction, BIC (*Bayesian Information Criterion*) dan DT (*Decision Theory*). Model TPM3uf +G yang dihasilkan dipilih menjadi model evolusi terbaik yang selanjutnya akan digunakan untuk model substitusi pada rekonstruksi pohon filogenetik.

Pembuatan pohon dengan metode *bayesian* dilakukan dengan menggunakan BEAUti dan BEAST versi 1.8.4 (Drummond dan Rambout, 2007). Kemudian, hasil pemograman dari BEAUti versi 1.8.4 disimpan dalam format XML (*Extensible Markup Language*). Model substitusi terbaik yang diperoleh dari penentuan jModelTest disesuaikan dengan *clock model uncorrelated log normal “relaxed” clock*. yang digunakan untuk analisis (Drummond *et al.*, 2007). Perhitungan MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) dilakukan berdasarkan kalibrasi eksternal yaitu setiap 5000 generasi pada 20.000.000 generasi (Janssens *et al.*, 2016). Kalibrasi ini diperoleh dari data penemuan fosil yang meliputi fosil benih *Ensete oregonense* yang berusia 43 juta tahun lalu (Manchester dan Kress, 1993), fosil daun *Zingiberopsis attenuata* yang berusia 65 juta tahun lalu (Hickey

dan Peterson, 1978), dan fosil *Zingiberales–Spirematospermum chandlerae* yang berusia 83,5 juta tahun lalu (Friss, 1988). Kemudian hasil berupa format XML (*Extensible Markup Language*) dari BEAST akan dibuatkan pohon filogenetik dengan visualisasi menggunakan FigTree versi 1.4.3.

Analisis tambahan yang digunakan adalah analisis similaritas genetik yang diawali dengan pencarian *distance* dengan program MEGA 5.0. Setelah hasil yang didapat berupa file *excel*, kemudian dihitung similaritas genetik dengan rumus (Finkelday, 2005):

$$\text{Nilai similaritas genetik (\%)} = (1 - \text{jarak genetik}) \times 100$$

3.5.3 Analisis Haplotipe

Analisis haplotipe dilakukan untuk mengetahui pola distribusi pisang Raja di pulau Jawa berdasarkan daerah ITS. Analisis pertama menggunakan *software* DNASP versi 5.0 (Librado dan Rozas, 2009) dan *Haplotype Network* versi 5.0.0.0.3 (Fluxus Technology, Ltd) yang bertujuan untuk mengetahui haplotipe yang terbentuk dari pohon filogenetik, aliran gen, kemungkinan persebaran evolusi yang terjadi dari pemetaan yang dihasilkan (Network 5.0, Guide). Pengolahan data dalam *software Haplotype Network* diawali dengan hasil *alignment* sekuen DNA hasil *sequencing* dengan menggunakan DNASP versi.5.0 lalu disimpan dalam format RDF (*Resource Description Framework*). Hasil *alignment* kemudian dianalisis keragaman haplotipenya menggunakan DNASP 5.0. Kemudian Hasil *alignment* dalam format RDF dimasukkan ke dalam program *Haplotype Network* versi 5.0.0.0.3 dan dianalisis menggunakan *network calculate*

dengan *option median joining* (MJ) kemudian disimpan dengan format OUT. Selanjutnya visualisasi haplotipe menggunakan *option draw network* dengan model dan interpretasi yang diinginkan.



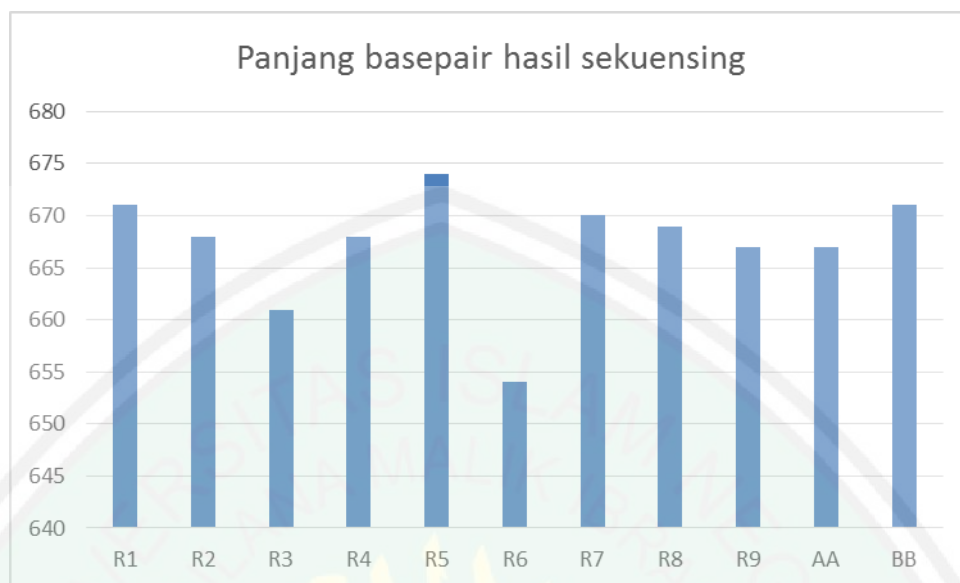
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Variasi Genetik Pisang Raja

Total 9 sampel pisang Raja dan 2 *outgroup* pisang liar (*M. Acuminata* dan *M. balbisiana*) yang diisolasi berhasil menunjukkan pita DNA. Panjang fragmen DNA yang berhasil diisolasi yaitu diatas 10.000 bp (Lampiran1). Hasil isolasi tersebut mempunyai intensitas yang bervariasi dari tipis (R1, R2, R7, AA), sedang (R3, R4, R5) hingga tebal (R6, R8, R9, BB) (Lampiran 1). Sementara itu, kemurnian DNA total (A_{260}/A_{280}) seluruh sampel berkisar antara 0,9 – 4,06 (Lampiran 2). Sedangkan konsentrasi DNA pisang hasil isolasi bervariasi mulai dari 57, 67 ng/ μ L hingga 218,05 ng/ μ L (Lampiran 2).

Amplifikasi daerah ITS pada 9 sampel pisang Raja dan 2 pisang liar (*M. acuminata* dan *M. balbisiana*) menghasilkan panjang ± 700 bp pada seluruh sampel (Lampiran 3). Seluruh sampel yang berhasil diamplifikasi kemudian disekuensing menggunakan primer ITS L dan ITS 4 (Lampiran 4). Kebanyakan hasil sekuensing daerah ITS dari 11 sampel yang digunakan memiliki panjang urutan DNA berkisar antara 654-674 bp (Gambar 4.1). Panjang sekuen daerah ITS pada tanaman pisang hampir sama dengan panjang sekuen ITS pada tumbuhan monokotil seperti sorghum ± 588 bp, padi ± 591 bp dan gandum ± 604 bp (Hsiao *et al.*, 1994; Nwakanma *et al.*, 2003).

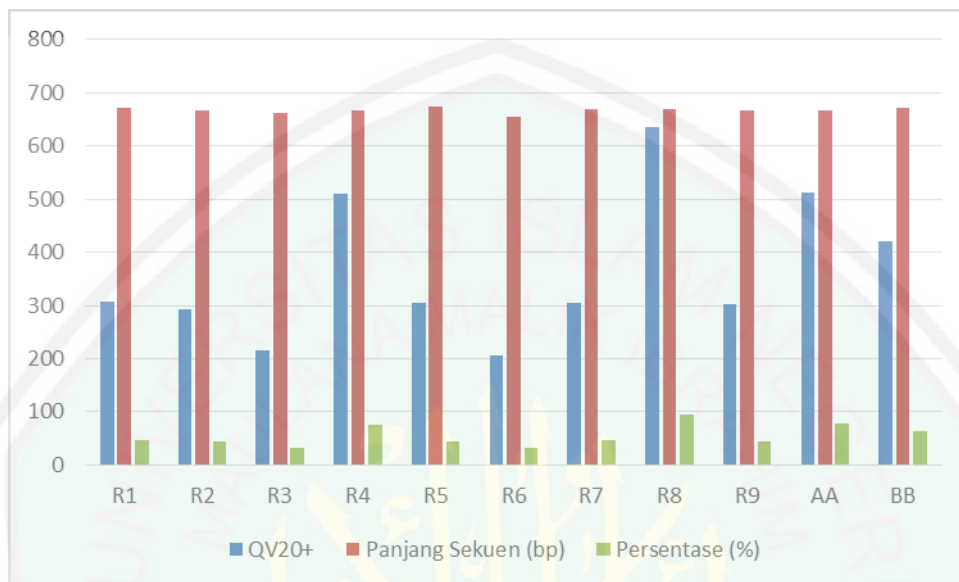


Gambar 4.1. Diagram panjang basa hasil sequencing daerah ITS pada 11 sampel DNA pisang. Ket: R1 (Raja Delima); R2 (Raja Sereh); R3 (Raja Kisto); R4 (Raja Bali); R5 (Raja Gareng); R6 (Raja Seribu); R7 (Raja Kutuk); R8 (Raja Brentel); R9 (Raja Lini); AA (*M. acuminata*); BB (*M. balbisiana*)

Hasil sekuensing dapat ditunjukkan dengan kualitas nukleotida yang ditandai dengan warna pada grafik, dan nilai *Quality Value* (QV) (Lampiran 5). Nilai QV20+ adalah total jumlah basa dalam grafik yang mempunyai kualitas nilai lebih dari atau sama dengan 20 (Sequence scanner, 2005). Persentase data QV20+ pada 11 sampel tergolong rendah. Sampel R6 (Raja Seribu) memiliki persentase yang paling rendah yakni 31,65 % sedangkan sampel R8 (Raja Brentel) memiliki persentase yang paling tinggi nilai 95,07 % (Gambar 4.1).

Rata-rata persentase kemiripan sekuen hasil *sequencing* daerah ITS pada 11 sampel yang dihasilkan dari program BLAST tergolong rendah dengan nilai sebesar 96 % dengan *genus* Musa (Tabel 4.1). Persentase kemiripan paling tinggi yakni 99 % adalah R6 dengan *Musa banksii* dan yang paling rendah adalah hanya 93 % yakni R5 dengan *Musa acuminata*. Rendahnya persentase kemiripan

pisang Raja diduga dikarenakan tidak banyak ditemukan sekuen daerah ITS pisang Raja lainnya pada NCBI.



Gambar 4.2 Diagram batang persentase rerata nilai QV+20 hasil sekuensing. Ket: R1 (Raja Delima); R2 (Raja Sereh); R3 (Raja Kisto); R4 (Raja Bali); R5 (Raja Gareng); R6 (Raja Seribu); R7 (Raja Kutuk); R8 (Raja Brentel); R9 (Raja Lini); AA (*M. acuminata*); BB (*M. balbisiana*)

Tabel 4.1 Hasil BLAST sekuen daerah ITS dari 9 sampel pisang Raja dan 2 *outgroup* pisang liar.

No	Sampel	Query Score	Kemiripan dengan	No akses
1	R1	96%	<i>Musa acuminata</i> microcarpa	FJ428087.1
2	R2	95%	<i>Musa acuminata</i> malasensis	KT257609.1
3	R3	96%	<i>Musa acuminata</i> zebrina	FJ428089.1
4	R4	97%	<i>Musa</i> hybrid cultivar	MF496120.1
5	R5	93%	<i>Musa acuminata</i>	KU512933.1
6	R6	99%	<i>Musa banksii</i>	KU215085.1
7	R7	96%	<i>Musa acuminata</i>	FJ428089.1
8	R8	97%	<i>Musa balbisiana</i>	FJ428102.1
9	R9	97%	<i>Musa acuminata</i>	FJ428089.1
10	AA	97%	<i>Musa acuminata</i>	FJ428089.1
11	BB	95%	<i>Musa balbisiana</i>	FJ428102.1

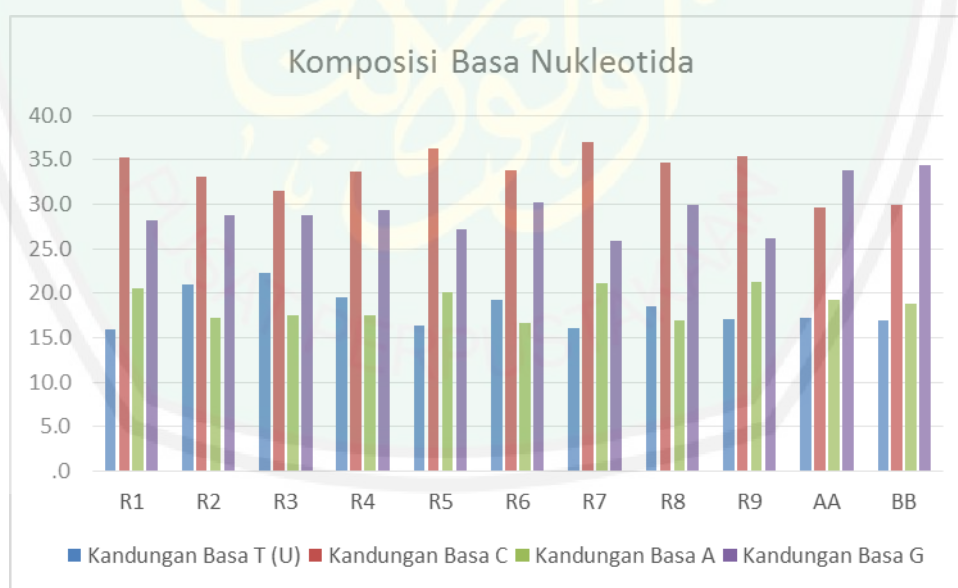
Ket: R1 (Raja Bandung); R2 (Raja Delima); R3 (Raja Sereh); R4 (Raja Kisto); R5 (Raja Bali); R6 (Raja jambe); R7 (Raja Gareng); R8 (Raja Madu); R9 (Raja Kriyak); R10 (Raja Seribu); R11 (Raja Kutuk); R12 (Raja Brentel); R13 (Raja Lini); AA (*M. acuminata*); BB (*M. balbisiana*)

Hasil pensejajaran (*alignment*) urutan basa nukleotida menghasilkan jumlah *basepair* akhir sebanyak 694 bp (Lampiran 6). Sekuen daerah ITS mempunyai daerah yang *conserved* (*conserved region*) yaitu antara sekuen no 1 hingga 196 (Tabel 4.2). *Conserved region* adalah daerah yang memiliki sekuen yang sama atau identik yang ditandai dengan tanda (*). *Conserved region* ini merupakan daerah yang tidak mengalami mutasi atau perubahan basa nukleotida. Semakin banyak *conserved region* pada sekuen maka akan semakin sedikit munculnya variasi genetik.

Keberadaan *insertion-deletion polymorphism* sebanyak 47 sites juga menjadi variasi genetik pada sekuen daerah ITS (Tabel 4.2). Peristiwa insersi dan delesi merupakan contoh mutasi yang dapat terjadi pada sekuen DNA sehingga mengakibatkan perubahan pada komposisi basa nukleotida (Nusifera, 2007). Perubahan basa yang banyak terjadi pada komposisi basa nukleotida daerah ITS antar pisang diduga akibat adanya mutasi atau penyusunan ulang materi genetik selama evolusi (Nusifera, 2007).

Perbedaan komposisi basa nukleotida T(U), A, G, C juga dapat menjadi faktor perubahan urutan basa. Basa nukleotida G dan C terlihat dominan pada semua sampel hasil *sequencing* (Gambar 4.3). Hasil rata-rata masing-masing kandungan basa T(U) adalah 18,2, kemudian basa A adalah 18,8, basa G adalah 29,7 dan basa C adalah 33,7 sehingga dari nilai rata-rata yang paling tinggi adalah basa G+C (Lampiran 7). Komposisi urutan DNA yang lebih banyak mengandung basa nukleotida G+C akan lebih rawan terhadap mutasi (Nusifera, 2007;

Ubaidillah dan Sutrisno, 2009). Basa nukleotida C akan mudah termetilasi dan sering terjadi kesalahan dalam penggandaan. Metilasi merupakan proses penambahan gugus metil pada ujung 5' dari sitosin secara kovalen (Nusifera, 2007; Ubaidillah dan Sutrisno, 2009). Adanya metilasi ini menginduksi terjadinya mutasi substitusi sehingga dapat menjadi penyebab utama mutasi pada suatu organisme. Mutasi insersi yang terjadi juga dapat memberikan perubahan besar pada proses transkripsi dan translasi organisme. Meskipun daerah ITS adalah daerah *intron* yang akan terpotong saat proses transkripsi, namun peran daerah ITS (*intron*) sangat penting dalam regulasi ekspresi gen. Daerah *intron* yang tidak terpotong akan mengakibatkan penyimpangan ekspresi gen (Nusifera, 2007; Ubaidillah dan Sutrisno, 2009).



Gambar 4.3 Diagram batang kandungan basa nukleotida hasil sequencing. Ket: R1 (Raja Delima); R2 (Raja Sereh); R3 (Raja Kisto); R4 (Raja Bali); R5 (Raja Gareng); R6 (Raja Seribu); R7 (Raja Kutuk); R8 (Raja Brentel); R9 (Raja Lini); AA (*M. acuminata*); BB (*M. balbisiana*)

Tabel 4.2 Kategori Variasi Genetik sampel Pisang Raja dan *Outgroup*

Tipe	Jumlah Variasi	Urutan basa ke-
<i>Conserved region</i>		1 – 196
<i>Insertion-deletion</i>	47 sites	
<i>Polymorphism</i>		
<i>Invariable (monomorphic)</i>	126 sites	
<i>variable (polymorphic)</i>	432 sites	
<i>Singleton (two variants)</i>	39 sites	1, 2, 3, 51, 87, 89, 109, 122, 163, 164, 165, 173, 176, 196, 220, 240, 259, 261, 278, 287, 308, 311, 315, 361, 387, 398, 430, 447, 485, 488, 502, 520, 536, 556, 557, 564, 566, 579, 604
<i>Singleton (three variants)</i>	8 sites	18, 100, 141, 152, 235, 322, 402, 526
<i>Parsimony-informative sites (two variants)</i>	220 sites	5, 6, 7, 8, 10, 13, 16, 19, 20, 24, 26, 27, 29, 30, 33, 36, 41, 46, 49, 52, 53, 61, 64, 66, 71, 73, 74, 75, 77, 82, 83, 84, 88, 93, 95, 96, 99, 101, 102, 103, 112, 113, 115, 117, 119, 120, 123, 128, 130, 131, 136, 139, 140, 142, 143, 146, 148, 150, 151, 153, 157, 160, 161, 162, 167, 168, 169, 172, 179, 185, 186, 187, 189, 190, 191, 193, 197, 200, 201, 202, 203, 209, 213, 222, 224, 230, 233, 234, 239, 241, 243, 244, 246, 248, 253, 256, 257, 258, 260, 267, 270, 272, 274, 275, 276, 277, 284, 285, 294, 296, 297, 301, 306, 314, 316, 318, 326, 327, 329, 332, 333, 336, 339, 342, 344, 345, 346, 350, 351, 355, 356, 357, 358, 359, 362, 365, 366, 368, 370, 371, 372, 374, 376, 381, 383, 385, 386, 389, 391, 394, 396, 399, 417, 419, 420, 425, 428, 431, 441, 442, 446, 449, 450, 452, 453, 456, 458, 462, 466, 468, 471, 472, 473, 477, 480, 481, 484, 486, 489, 491, 493, 494, 495, 497, 499, 501, 503, 508, 509, 511, 514, 515, 525, 527, 528, 529, 532, 533, 534, 538, 539, 546, 547, 551, 555, 559, 563, 573, 576, 580, 581, 582, 587, 591, 592, 595, 599, 600, 601.
		166, 178, 180, 183, 194, 195, 210, 215, 216, 219, 223, 227, 228, 229, 232, 236, 242, 245, 247, 249, 250, 254, 255, 262, 263, 264, 265, 269, 271, 273,

<i>Parsimony-informative sites (three variants)</i>	145 sites	283, 289, 290, 292, 293, 295, 299, 300, 302, 303, 304, 307, 309, 313, 317, 323, 325, 328, 331, 334, 335, 340, 341, 343, 347, 349, 353, 364, 369, 373, 375, 378, 379, 380, 384, 388, 390, 392, 393, 397, 401, 403, 405, 406, 408, 409, 410, 411, 413, 421, 422, 423, 424, 427, 432, 433, 434, 435, 436, 438, 439, 440, 443, 454, 455, 457, 460, 464, 465, 469, 470, 475, 476, 478, 479, 482, 483, 487, 500, 504, 505, 506, 510, 513, 518, 519, 523, 524, 531, 535, 537, 540, 544, 545, 552, 553, 554, 558, 561, 562, 565, 567, 570, 572, 574, 583, 584, 585, 586, 588, 589, 597, 602, 603 605.
---	-----------	---

Variable site adalah daerah yang memiliki sedikitnya dua jenis nukleotida. *Variable site* terdiri dari *singleton* dan *parsimony-informative sites*. *Singleton site* merupakan situs dimana hanya ada satu taksa yang berbeda atau hanya satu taksa yang mengalami perubahan basa. Adanya variasi *singleton* ini menunjukkan karakter autopomorf (Hidayat dan Pancoro, 2005). *Singleton site* tidak dapat memberikan informasi mengenai pohon mana yang bersifat parsimonius. *Singleton* dapat berupa *singleton two variants*, *three variants* atau *four variants* (Tabel 4.2). *Singleton two variants* artinya terdapat 2 jenis nukleotida yang berbeda pada posisi tersebut dan terdapat 1 taksa yang berbeda dengan taksa lainnya, dan *singleton three variants* artinya terdapat 3 jenis nukleotida yang berbeda pada posisi tersebut dan terdapat 2 taksa yang berbeda dengan taksa lainnya (Lampiran 8).

Sementara itu, *Parsimony-informative site* merupakan situs yang sedikitnya memiliki dua jenis nukleotida dan dua dari mereka muncul dengan frekuensi minimum sebanyak dua. *Parsimony-informative site* juga dibagi menjadi *Parsimony-informative sites two variants*, *three variants* dan lain (Tabel 4.2).

Parsimony-informative sites two variants artinya memiliki 2 jenis basa nukleotida pada posisi tersebut dan keduanya muncul minimal sebanyak 2 kali sedangkan *parsimony-informative sites three variants* artinya memiliki 3 jenis basa nukleotida pada posisi tersebut dan 2 dari 3 nukleotida tersebut muncul minimal sebanyak 2 kali. Total *Parsimony-informative sites* adalah 365 sites (Tabel 4.2) yang dapat menunjukkan adanya frekuensi kejadian mutasi yang tinggi

Banyaknya kategori variasi genetik yang dihasilkan dari pisang Raja berdasarkan daerah ITS merupakan bukti nyata dari Allah SWT atas segala ciptaan-Nya yang bermacam-macam. Meskipun semua tumbuhan pisang tumbuh pada habitat yang sama, namun masih banyak perbedaan ataupun variasi yang ditemukan pada sekuen daerah ITS sampel pisang. Perbedaan komposisi basa nukleotida di masing-masing sampel pisang memungkinkan adanya perbedaan ekspresi gen yang ditimbulkan. Perbedaan ekspresi gen yang ditimbulkan dapat berupa sifat genotip (sifat yang tidak tampak) maupun fenotip (sifat yang tampak). Salah satu contoh sifat yang berkaitan dengan sifat fenotip adalah perbedaan rasa dari buah yang dihasilkan. Bukti perbedaan rasa dari buah-buahan yang dihasilkan ini tersurat dalam firman Allah SWT dalam al-Qur'an surat ar-Rad (13) 4:

فِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَاوِرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِنْ أَعْنَابٍ وَزَرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنْوَانٌ وَغَيْرُ صِنْوَانٍ يُسْقَى
بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفَضِّلُ بَعْضَهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ ۚ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ (٤)

Artinya: “Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon kurma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berpikir”. (QS. ar-Rad (13):4)

Kalimat inti yang terletak pada potongan ayat *وَنُفِثَ لَهَا عَلَىٰ بَعْضِ فِي الْأُكُلِ* dijelaskan dalam tafsir bahwa Allah SWT melebihkan sebagian tanaman itu berbeda dengan sebagian yang lain salah satunya tentang rasanya (Jazairi, 2007). Apa yang dapat dirasakan, ada yang manis, asam, lezat dan tidak enak rasanya. Semua itu merupakan variasi yang Allah SWT ciptakan bagi mahluk-Nya. Mahalliy (1990) menyatakan bahwa Allah SWT menciptakan pohon kurma, sekelompok padi-padian dan buah anggur, dimana semua tanaman mendapat siraman jenis air yang sama, namun berlainan hasil panennya. Demikian juga dengan hasil penelitian 11 sampel pisang Raja berdasarkan sekuen yang sama-sama diambil dari daerah ITS (*internal transcribe spacer*). Dimana Allah SWT menciptakan daerah ITS di setiap organisme maupun individu, meskipun sekuennya memiliki kesamaan, dan diambil dari daerah ITS yang sama tetapi tetap terdapat perbedaan sekecil apapun yang tergambarkan melalui variasi genetik yang dihasilkan.

Potongan ayat tersebut menjadi bukti kehendak, keesaan dan kekekalan Allah SWT serta petunjuk bagi siapa saja yang tidak mengenal Allah SWT. Allah mengingatkan di dalam firman-Nya, meskipun mahluk ciptaan-Nya berdampingan tetapi masih terdapat perbedaan. Padahal perbedaan itu muncul dari tanah yang sama dan disirami dengan air yang sama. Keadaan seperti ini tidak akan terjadi kecuali atas kekuasaan Allah. Demikian dengan seluruh variasi genetik yang ditemukan dalam hasil penelitian adalah hasil dari kekuasaan Allah SWT yang memiliki ilmu tidak terbatas dan juga hikmah yang tidak luput dari segala sesuatu. Allah SWT yang menciptakan segala sesuatu dan mengetahuinya (Jazairi, 2007).

Al Quran'an surat ar-Rad (13): 4 adalah peringatan bagi manusia untuk berpikir dan merenungi serta mempelajari peristiwa yang ada di bumi sebagai tanda kekuasaan Allah SWT agar dapat dijadikan sarana untuk lebih bersyukur dan mendekatkan diri kepada Allah SWT.

4.2 Hubungan Kekerabatan dan Evolusi Pisang Raja

Hubungan kekerabatan 9 sampel pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta menggunakan metode *maximum parsimony* (MP), *neighbor joining* (NJ), *maximum likelihood* (ML) dan bayesian ternyata berkerabat dekat berdasarkan genom. Berdasarkan keempat metode yang digunakan (MP, NJ, ML dan Bayesian) menampilkan hasil pohon filogenetik yang sama. Dimana keempat metode mengelompokkan 11 sampel menjadi 4 *clade in-group* dan 1 *clade outgroup*. Penambahan *outgroup* (*M. balbisiana* dan *M. acuminata*) dilakukan guna mendapatkan informasi yang meyakinkan dari sekuen yang berhubungan (Hidayat dan Pancoro 2008). *Outgroup* ini sangat dibutuhkan untuk menghasilkan polarisasi karakter atau ciri, yaitu karakter apomorfik dan plesiomorfik. Karakter apomorfik adalah karakter yang diturunkan pada *ingroup* (*clade* I, II, II, IV) sedangkan karakter plesiomorfik merupakan karakter primitif yang terdapat pada *outgroup* (Hidayat dan Pancoro 2008).

Pohon yang dihasilkan oleh metode *Maximum parsimony* (MP) membentuk 4 *clade* pada sampel *in-group* didukung dengan nilai *bootstrap* 100 (Gambar 4.4). Dimana nilai *bootstrap* menjadi tolak ukur penentu tingkat kepercayaan pohon filogeni (Hall, 1942). Semakin besar nilai *bootstrap*, maka semakin tinggi tingkat

kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi tersebut (Nei dan Kumar, 2000).

Topologi pohon yang dihasilkan melalui metode *Maximum parsimony* (MP) (Gambar 4.4) dan *Neighbor Joining* (NJ) (Gambar 4.5) menunjukkan pola yang dikotomi. Dikotomi adalah topologi pohon yang memiliki dua kelompok besar garis keturunan. *Cladogram* yang dihasilkan dari metode MP dan NJ terdiri dari: *Clade* I untuk kelompok genom AAB (Raja Kisto, Raja Seribu, Raja Sereh), *clade* II untuk kelompok genom ABB (Raja Brentel dan Raja Bali), *clade* III untuk genom AAA yaitu Raja Delima dan *clade* IV untuk kelompok genom AAB (Raja Lini, Raja Kutuk, dan Raja Gareng). Sementara itu, *clade* V tetap diisi oleh *outgroup* (*M. acuminata* dan *M. balbisiana*) dengan nilai *bootstrap* 100 (Gambar 4.4 dan 4.5).

Sedangkan *cladogram* yang dibentuk dengan metode ML terdiri dari (Gambar 4.6): *Clade* I terdiri dari kelompok genom AAB (Raja Lini, Raja Kutuk, dan Raja Gareng). *Clade* II untuk genom AAA yaitu Raja Delima. *Clade* III untuk kelompok genom AAB (Raja Kisto, Raja Seribu, Raja Sereh) dan *clade* IV untuk kelompok genom ABB (Raja Brentel dan Raja Bali) serta *clade* V diisi *oloutgroup* (*M. acuminata* dan *M. balbisiana*) dengan nilai *bootstrap* yang sama dengan metode sebelumnya yakni 100 (Gambar 4.6).

Sementara itu *cladogram* yang dihasilkan dari metode bayesian mengelompok menjadi (Gambar 4.7): *Clade* I yang terdiri dari kelompok genom AAB (Raja Lini, Raja Kutuk, dan Raja Gareng). *Clade* II untuk genom AAA yaitu Raja Delima. *Clade* III untuk kelompok genom AAB (Raja Kisto, Raja Seribu, Raja Sereh) dan *clade* IV untuk kelompok genom ABB (Raja Brentel dan Raja Bali)

serta *clade* V diisi *outgroup* (*M. acuminata* dan *M. balbisiana*) dengan nilai *bootstrap* yang sama dengan metode sebelumnya yakni 100 (Gambar 4.7).

Pengelompokkan semua *clade* pada 4 metode yang digunakan diduga sama halnya dengan Ekasari *et al* (2012) dimana pohon filogenetiknya mengelompok berdasarkan genom (AAB, ABB, dan AAA). Meskipun memiliki pengelompokkan yang sama, namun keempat metode tetap menghasilkan *cladogram* berdasarkan masing-masing pendekatan yang digunakan. Pada metode MP (Gambar 4.4) memiliki kelebihan dimana pohon yang direkonstruksi pada umumnya terbebas dari asumsi-asumsi model substitusi nukleotida yang diterapkan pada algoritme lainnya seperti algoritme pada metode ML (Holder dan Lewis, 2003). Adanya kebebasan asumsi model substitusi ini, pohon MP dinilai lebih dapat menggambarkan hubungan kekerabatan yang sebenarnya ketika divergensi antar sekuen cukup rendah. Selain itu metode MP menggunakan algoritme *character-based* yang cukup akurat dengan waktu komputasi yang relatif lebih cepat dari algoritme *character-based* lainnya (Holder dan Lewis, 2003). Penggunaan metode *character-based* ini berasumsi bahwa pohon terbaik yang dibentuk karena sejumlah karakteristik yang sama yang diturunkan dari nenek moyang. Hal ini dibuktikan dengan genom yang memiliki kesamaan akan berada atau mengelompok pada satu *clade*.

Sementara itu, pendekatan dalam metode NJ (Gambar 4.5) menggunakan metode jarak dengan prinsip pengelompokkan taksa berdasarkan nilai jarak evolusioner pasangan-pasangan *operational taxonomy unit* dimana setiap percabangan yang terdapat dalam pohon filogeni berevolusi pada kecepatan yang

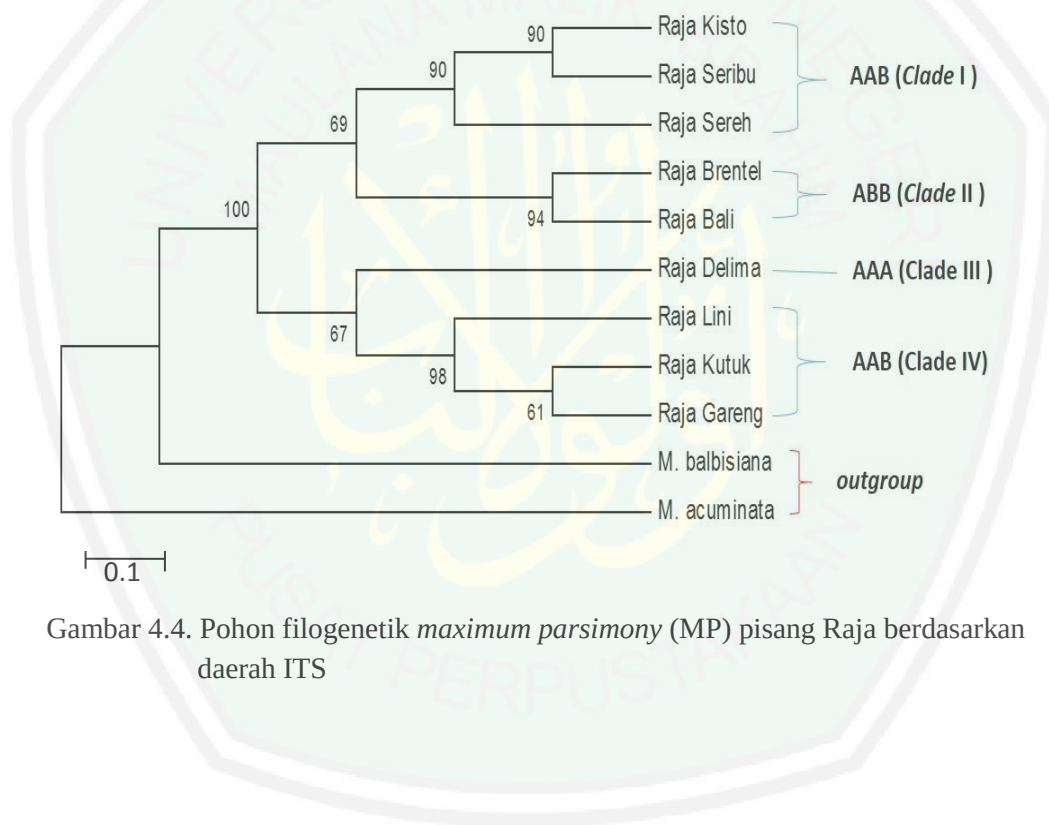
tidak sama (Zein dan Sri, 2008).

Sedangkan prinsip pendekatan dalam metode (ML) (Gambar 4.6) adalah menganggap perubahan-perubahan diantara semua basa nukleotida adalah sebanding (Felsenstein, 1981). Kelemahan metode ini adalah membutuhkan waktu yang lama untuk menghitung, walaupun telah dikembangkan algoritma baru yang dianggap dapat mempercepat proses perhitungan (Guindon dan Gascuel, 2003; Felsenstein, 1981).

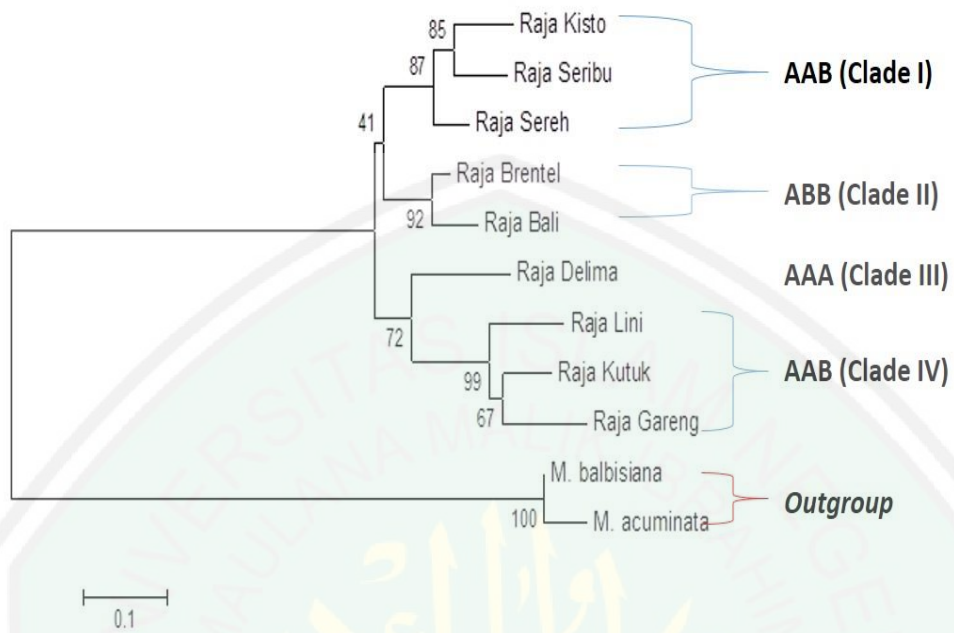
Bentuk kompleks dan perkembangan dari metode ML adalah metode Bayesian (Gambar 4.7) yang akhir-akhir ini sering digunakan. Jika berdasarkan wilayah asalnya, maka pisang-pisang tersebut juga saling berkerabat dekat sehingga dapat dikatakan bahwasanya pisang-pisang Raja yang termasuk *dalam in-group* berevolusi dari garis keturunan nenek moyang pisang liar (*M. acuminata* dan *M. balbisiana*) yang kemudian berevolusi akibat kawin silang berjuta tahun lalu yang kemudian memunculkan pisang-pisang kultivar seperti pisang Raja.

Jika dilihat dari wilayah asalnya maka pisang Raja Brentel dari Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah dan Raja Bali asal Temanggung, Jawa Tengah mengelompok pada satu *clade* yakni *clade* II (Gambar 4.4 dan 4.5). Hal ini menandakan bahwa ketiga pisang tersebut berkerabat dekat karena wilayah. Begitu pula dengan *clade* IV yakni Raja Kutuk dari Kabupaten Purworejo bersama Raja Gareng dari Temanggung, Jawa Tengah dan Raja Lini asal Gunung Kidul berada pada satu kelompok (Gambar 4.4 dan 4.5). Namun pada Raja Kisto asal Banyuwangi, Jawa Timur tidak berada satu *clade* dengan Raja Delima yang juga berasal dari Kabupaten Malang Jawa Timur. Pisang Raja Kisto

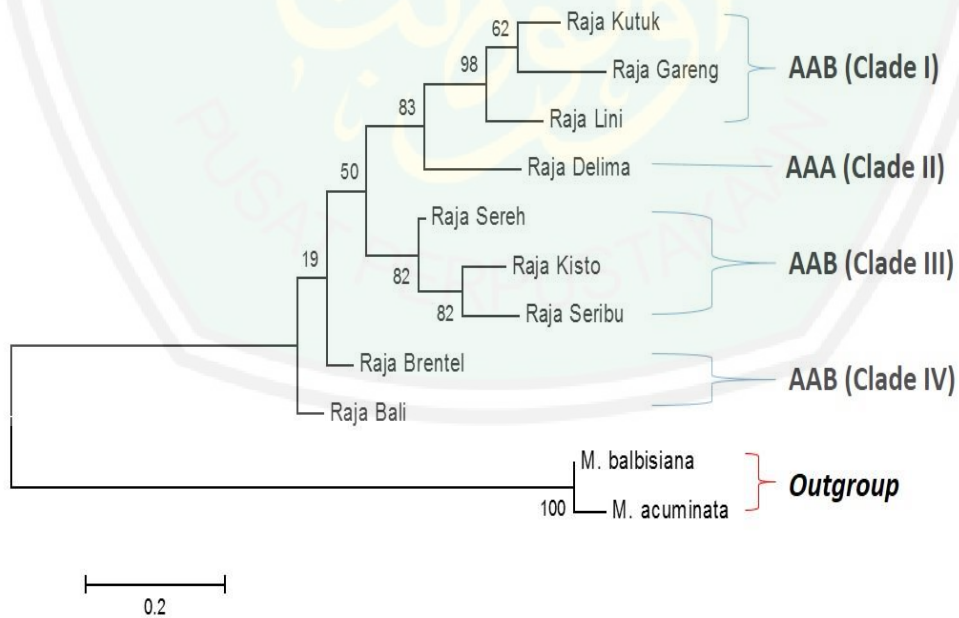
mengelompok dengan Raja Seribu asal Jakarta dan Raja Sereh dari Purworejo, Jawa Tengah pada *clade* I sehingga pada *clade* III hanya beranggotakan Raja Delima (Gambar 4.4 dan 4.5). Sama halnya dengan pohon metode ML dan bayesian bahwa Raja Delima mengelompok sendiri (Gambar 4.7 dan 4.8). Hal ini mendukung anggapan bahwa semua hasil pohon filogenetik mengelompok dan berkerabat berdasarkan genomnya.



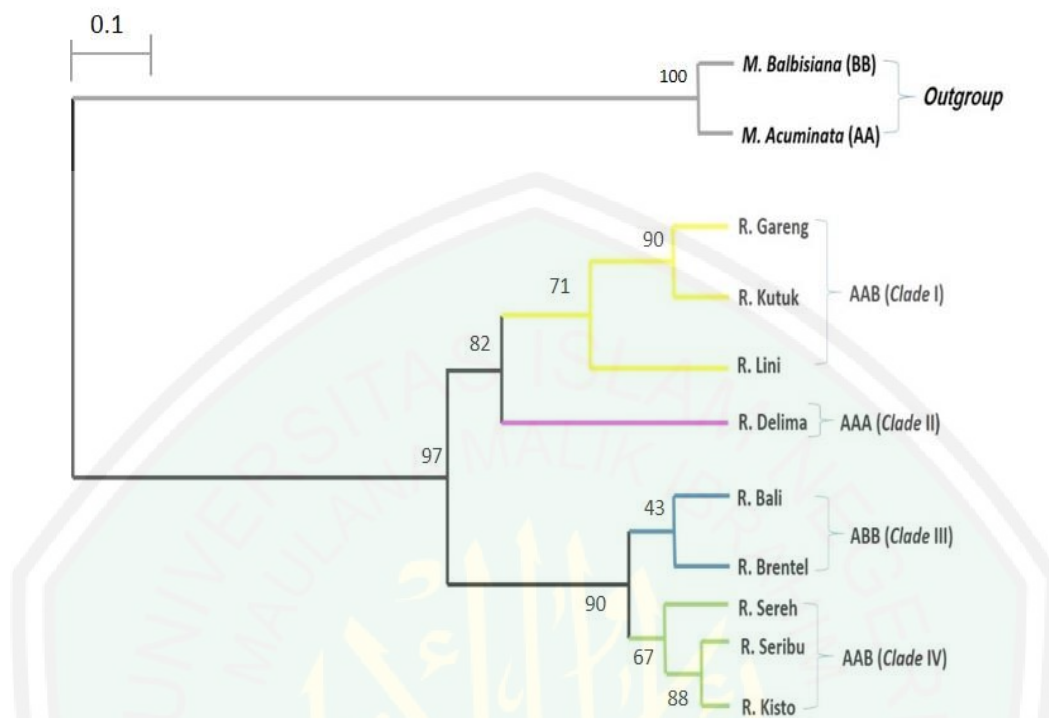
Gambar 4.4. Pohon filogenetik *maximum parsimony* (MP) pisang Raja berdasarkan daerah ITS



Gambar 4.5. Pohon filogenetik *neighbor joining* (NJ) pisang Raja berdasarkan daerah ITS.



Gambar 4.6. Pohon filogenetik *maximum likelihood* (ML) pisang Raja berdasarkan daerah ITS



Gambar 4.7. Pohon filogenetik bayesian pisang Raja berdasarkan daerah ITS.

4.2.1 Similaritas Genetik

Nilai similaritas genetik adalah kesamaan genetik antara pisang-pisang Raja yang diperoleh dengan rumus persentase $(1-p\text{-distance}) \times 100$. Dimana $p\text{-distance}$ adalah nilai yang menunjukkan proporsi situs yang berbeda diantara beberapa urutan DNA yang dianalisis sehingga dapat menggambarkan keragaman DNA yang dibandingkan (Nei dan Kumar, 2000). Persentase similaritas genetik tertinggi dari keseluruhan sampel baik *in-group* maupun *outgroup* dimiliki oleh sampel R8 (ABB) dan BB dengan nilai 96,754 % diduga karena *Musa balbisiana* mendonorkan semua genomnya yakni BB sehingga sampel R8 memiliki genom (Tabel 4.3).

Sementara itu, jika dilihat wilayah *in-group* saja, maka persentase tertinggi adalah 89,426 % yang dimiliki antara sampel R8 (ABB) dan R4 (ABB) (Tabel 4.3). Hal ini jelas dikarenakan kedua genom pisang sama yaitu AAB dan kesamaan zonasi pada sampel R8 (AAB) yang berasal dari Sukoharjo (Jawa Tengah) dan R4 (AAB) berasal dari Bantul (Jawa Tengah). Dimana kedua sampel memiliki zonasi yang sama yakni berada di Jawa Tengah. Sementara itu persentase paling rendah tetap R5 (AAB) dan R6 (ABB) dengan nilai 56,823 % (Tabel 4.3). Hal ini karena genom dari kedua sampel berbeda, sehingga kesamaan genetiknya pun rendah. Selain itu diduga karena perbedaan zonasi antara R5 (AAB) berasal dari Temanggung (Jawa Tengah) dan R6 (ABB) berasal dari Jakarta sehingga perbedaan zonasi diduga menimbulkan similaritas genetik yang rendah (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Similaritas genetik 11 sampel pisang (*in-group* dan *outgroup*) berdasarkan ITS

	R2	BB	R3	R7	R5	R6	R9	R8	AA	R1	R4
R2											
BB	79.64										
R3	87.37	74.42									
R7	66.27	62.90	61.60								
R5	64.70	64.40	60.04	82.26							
R6	85.43	69.29	86.25	58.29	56.82						
R9	69.24	72.57	65.67	83.13	77.00	60.02					
R8	82.73	96.75	76.88	64.73	67.18	72.31	75.29				
AA	82.33	92.09	77.56	67.75	71.53	71.68	77.40	94.88			
R1	70.97	68.55	64.04	69.35	68.92	64.27	71.21	71.97	72.71		
R4	79.02	87.20	72.19	64.16	63.13	65.61	71.75	89.42	87.77	65.73	

Ket: R1 (Raja Delima); R2 (Raja Sereh); R3 (Raja Kisto); R4 (Raja Bali); R5 (Raja Gareng); R6 (Raja Seribu); R7 (Raja Kutuk); R8 (Raja Brentel); R9 (Raja Lini); AA (*M. acuminata*); BB (*M. balbisiana*)

4.3 Keragaman Haplotipe

Haplotipe yang dihasilkan sampel *in-group* dan *outgroup* sebanyak 11 haplotipe (Gambar 4.8). Haplotipe merupakan kelompok sekuen DNA tertentu dalam sebuah *cluster* gen yang cenderung diwariskan bersama-sama sebagai sebuah kelompok (Gusfield, 2001). Keragaman haplotipe pada 11 sampel yang diuji memiliki keragaman yang tinggi ($H_d = 1,000$) sedangkan keragaman haplotipe yang dinilai rendah adalah jika nilai ($H_d = <0,5000$) maka keragaman yang rendah ini dianggap memiliki banyak kesamaan sekuen sehingga dapat diartikan memiliki nenek moyang yang sama.

Terbentuk 11 kelompok haplotipe (H) yang masing-masing terdiri dari 1 anggota haplotipe (Lampiran 10). H1 berasal dari Purworejo (Jawa Tengah), H 2 berasal dari Sukoharjo (Jawa Tengah). H3 berasal dari Banyuwangi (Jawa Timur) kemudian di H4 berasal dari Purworejo (Jawa Tengah), sedangkan H5 dari Temanggung (Jawa Tengah) (Gambar 4.8). Selanjutnya, H6 asal Jakarta dan H7 asal Kabupaten Gunung Kidul (Jawa Tengah) serta H8 berasal dari Kabupaten Malang (Jawa Timur) (Gambar 4.8). Pada H9 berisi sampel yang berasal dari Bantul (Jawa Tengah), sedangkan H10 dan 11 diisi oleh sampel dari *M. balbisiana* dan *M. acuminata* selaku *outgroup* (Gambar 4.8).

Dari 11 haplotipe maka terbentuk 4 jaringan haplotipe berdasarkan daerah ITS (Gambar 4.8). Dimulai dari jaringan haplotipe yang dibentuk oleh kedua *outgroup* berwarna abu-abu (H10 dan H11) (Gambar 4.8). Kemudian mengalir ke jaringan haplotipe 1 yang terdiri dari H4, H5 dan H7, dimana semua haplotipe berasal dari Jawa Tengah. Mulai dari jaringan haplotipe 1 mengalir ke jaringan

haplotipe 2 (H2 dan H9) yang juga berasal dari Jawa Tengah dan mengalir ke jaringan haplotipe 3 yang terdiri dari (H1, H3 dan H6) (Gambar 4.8). Dimana H1 ini merupakan wilayah Jawa Tengah, yang berkumpul dengan H3 wilayah Jawa Timur dan H6 wilayah Jakarta (Gambar 4.8). Hasil analisis berdasarkan genom, maka ketiga haplotipe walaupun berbeda daerah asal tapi sama-sama bergenom AAB. Ketiga haplotipe berbeda asal daerah ini mengelompok, diduga karena H3 dan H6 dahulu memang asalnya dari Jawa Tengah kemudian dibawa oleh manusia, ditanam dan dibudidayakan di wilayah Jakarta dan Jawa Timur sehingga memiliki nama lokal yang berbeda yakni menjadi H6 (Raja Seribu) dan H3 (Raja Kisto).

Jaringan haplotipe 4 yakni hanya ada 1 haplotipe yaitu H8 yang berasal dari Malang, Jawa Timur (Gambar 4.8). H8 ini adalah pisang Raja Delima yang bergenom AAA. Diduga jaringan haplotipe 4 ini mengelompok sendiri berdasarkan genom AAA. Kemungkinan H8 ini dahulunya adalah hasil persilangan antara aliran gen dari jaringan haplotipe 1 dan jaringan haplotipe 2 sehingga menjadi haplotipe 4 yang bergenom AAA.

Berdasarkan 4 jaringan haplotipe yang terbentuk, maka dapat dinyatakan bahwa kebanyakan haplotipe mengelompok pada wilayah Jawa Tengah. Sehingga dapat dikatakan awal munculnya pisang Raja diduga di wilayah Jawa Tengah yang kemudian menyebar di berbagai dataran Jawa. Hal ini mungkin karena wilayah Jawa Tengah yang menjadi pusat pulau Jawa, ditambah lagi dengan adanya kerajaan di wilayah Yogyakarta sehingga banyak ritual-ritual keagamaan maupun upacara adat yang sampai sekarang sering diselenggarakan. Upacara dan

ritual yang diselenggarakan kebanyakan menggunakan dengan memanfaatkan pisang Raja sebagai alat ritual keagamaan. Sebagaimana pada Firdausi (2015) dan Pramita (2013) bahwa pemanfaatan pisang Raja selain sebagai buah yang sering dikonsumsi juga dapat digunakan sebagai obat tradisional dan keperluan ritual serta upacara-upacara adat. Hapsari *et al* (2017) menambahkan bahwa pisang-pisang di Indonesia sering dimanfaatkan dalam upacara daerah, misalnya tandan pisang Raja yang dimanfaatkan untuk pintu atau gerbang di upacara perkawinan di daerah Solo, Jawa Tengah. Selain iklim yang sesuai, budidaya yang dilakukan oleh masyarakat di daerah juga yang menjadi penentu keberadaan sentra tanaman pisang, khususnya pisang Raja yang menjadi kebutuhan sehingga banyak ditanam dan di budidayakan oleh masyarakat di Jawa Tengah (Nasution dan Yamada, 2001).

Selain itu, alasan kondisi geografi yang diduga menjadi faktor lain yang memengaruhi aliran gen pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta. Dimana mayoritas wilayah Jawa Tengah (Kabupaten Sukoharjo, Purworejo, Gunung Kidul, Temanggung dan Bantul) memiliki wilayah daratan yang dikelilingi pegunungan ataupun perbukitan, kemudian curah hujan yang tergolong sedang hingga tinggi dan suhu udara rata-rata harian 27,7° C. Kemudian wilayah Jawa Tengah memiliki kelembaban rata-rata yang tinggi antara 70 – 90 %. Keberadaan tanah yang dominan adalah jenis tanah regosol yang ada pada daratan Bantul (Pemb. Bantul, 2017; Pemb. Sukoharjo, 2017; Pemb. Purworejo, 2017; Pemb. Gunung Kidul, 2017; Pemb. Temanggung, 2017).

Persamaan kondisi geografis di mayoritas wilayah Jawa Tengah ini yang diduga mengakibatkan H2, H4, H5, H7, H9 berkumpul berdasarkan zonasi (Gambar 4.8).

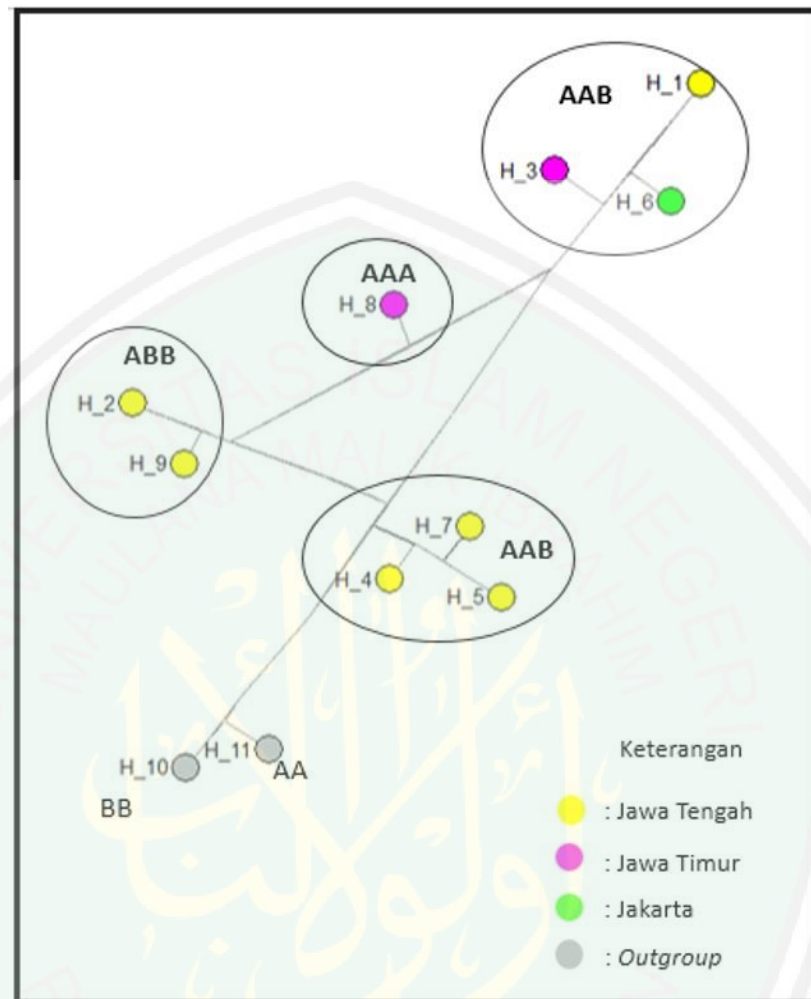
Sementara itu kondisi geografis di wilayah Jawa Timur seperti di Kabupaten Malang, rata-rata memiliki kelembaban yang tinggi sekitar 90.74 % dengan suhu rata-rata 26.1 – 28.3 °C dan curah hujan rata-rata berkisar antara 1.800 – 3.000 mm per tahun (Pekab Malang, 2017). Sedangkan di wilayah Banyuwangi rata-rata curah hujan mencapai 225,9 mm, dan kelembaban udaranya tergolong tinggi sekitar 82 %. Sementara itu, rata-rata suhu udara sedang antara 25,6 °C hingga 29,60 °C (Pekab Banyuwangi, 2017).

Berbeda dengan Jawa Timur dan Jawa Tengah yang hampir sama kondisi geografisnya, maka wilayah Jakarta memiliki curah hujan rata-rata sepanjang tahun 2000 mm. Dimana, wilayah DKI Jakarta termasuk daerah tropis beriklim panas dengan suhu rata-rata per tahun 27 °C dengan temperatur tahunan maksimum 32 °C dan minimum 22 °C serta memiliki kecepatan angin rata-rata 11,2 km/jam.

Terpisahny H8 (AAA) dan H3 (AAB) yang memiliki wilayah yang sama diduga kuat akibat genom yang sangat berbeda sehingga pada jaringan haplotipe 2 mengelompok berdasarkan kesamaan genom AAB (Gambar 4.8). Adanya perbedaan kondisi geografis suatu daerah akan sangat mempengaruhi intensitas cahaya matahari, kadar karbondioksida dan suhu lingkungan suatu daerah (Nasution dan Yamada, 2001). Dataran rendah mempunyai intensitas cahaya matahari, kadar karbondioksida dan suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan dataran tinggi. Sementara itu suhu optimum untuk pertumbuhan pisang adalah

sekitar 27 °C dan suhu maksimumnya 38 °C (Nasution dan Yamada, 2001) sehingga wilayah Jawa Timur, dan Jawa Tengah sangat cocok untuk pertumbuhan tanaman pisang. Proses adaptasi yang sangat lama diduga menyebabkan terjadinya mutasi pada urutan DNA khususnya daerah ITS sehingga munculnya variasi genetik pada pisang Raja di wilayah yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa secara umum jarak geografi tidak mempengaruhi kemunculan pisang Raja yang baru.

Pengelompokkan jaringan haplotipe sesuai dengan pengelompokkan *clade* pada pohon filogenetik. Meskipun jaringan haplotipe 1 (AAB) memiliki zonasi yang sama dengan jaringan haplotipe 2 (ABB) namun terjadi pemisahan jaringan haplotipe diduga karena perbedaan genom yang dimiliki dari masing-masing haplotipe (Gambar 4.8).



Gambar 4.8 Haplotipe yang terbentuk dari 11 sampel pisang Raja. Ket: H1: (R2) Raja Sereh; H2: (R8) Raja Brentel; H3:(R3) Raja Kisto; H4: (R7) Raja Kutuk; H5: (R5) Raja Gareng; H6: (R6) Raja Seribu; H7: (R9) Raja Lini; H8: (R1) Raja Delima; H9: (R4) Raja Bali; H10: (BB) *M. balbisiana*; H11: (AA) *M. acuminata*

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini diantaranya:

1. Variasi genetik 9 sampel *in-group* dan 2 sampel *out-group* berdasarkan daerah ITS tergolong tinggi. Hal ini dikarenakan sekuen daerah ITS merupakan sekuen dengan tingkat mutasi dan polimorfisme yang cukup tinggi. Sehingga sekuen daerah ITS cocok menjadi tolak ukur dalam analisis variasi genetik dan filogenetik.
2. Evolusi pisang Raja berdasarkan daerah ITS diduga berasal dari garis keturunan nenek moyang pisang liar (*M. acuminata* dan *M. balbisiana*) yang kemudian berevolusi akibat kawin silang berjuta tahun yang lalu dan memunculkan pisang-pisang Raja yang saling berkerabat dekat berdasarkan genomnya.
3. Hubungan antara filogenetik dan geografi terhadap persebaran pisang Raja di wilayah Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta memusat atau mengelompok pada wilayah Jawa Tengah sehingga diperkirakan aliran gen daerah ITS berdasarkan haplotipe mengalir dari wilayah Jawa Tengah ke Jawa Timur. Jawa Tengah menjadi pusat awal persebaran pisang Raja diduga karena Jawa Tengah menjadi pusat pulau Jawa terutama wilayah kesultanan Yogyakarta yang sering menggunakan pisang Raja sebagai ritual keagamaan sehingga pisang Raja banyak ditanam dan dibudidayakan di wilayah Jawa Tengah.

5.2 Saran

Sekuen daerah ITS merupakan daerah yang repetitif sehingga disarankan pada penelitian selanjutnya agar menggunakan tekning kloning gen pada daerah ITS sebelum dilakukan proses sekuensing. Agar pada tahap sekuensing benar-benar didapatkan daerah sekuen ITS yang sama.



DAFTAR PUSTAKA

- Argent. 1976. The Wild Bananas of Papua New Guinea. *Notes from the Royal Botanic Garden*. 35 (1)
- Augustburger, F., J. Beger, U. Censkowsky, P. Heid, J. Milz dan C. Streit. 2001. *Organic Farming in Tropics and Subtropic (Banana)*. German : United Nations Convergence on Trade and Development
- Awise, J. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. London: President and Fellows of Harvard College
- Badan Pusat Statistik. 2018. *Produksi Tanaman Pisang Seluruh Provinsi*. Diakses dari [www. bps. go. id](http://www.bps.go.id) pada tanggal 15 Februari 2018.
- Baldwin, B.G. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Sources of Evidence on Angiospermae Phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 2472 (77)
- Brinkman, F, dan D. Leipe. 2001. Phylogenetic Analysis. In: *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analisis of Gene and Protein*. BAXEVANIS, A.D. and B.F.F. OUELLETTE (Eds). *John Willey & Sons*
- Brown, N., S. Venkatasamy, G. Khittoo, T. Bahorun dan S. Jawaheer. 2009. Evalution of Genetic Diversity Between 27 Banana Cultivars (*Musa* spp.) in Mauritius using RAPD Markers. *African Journal of Biotechnology*. 8 (9)
- Brown, S.M. 1996. *Development And Application Of Simple Sequence Repeats (SSR) Loci For Plant Genome Analysis, Methods Of Genome Analysis In Plants*. New York: CRC Pr
- Busaidi. 2013. Banana Domestication on the Arabian Peninsula : review of their domestication history. Directorate General of Agriculture and Livestock Research. *J. Academic*. 5 (11)
- Cahyono, B. 1996. *Banana, Cultivation and farming business*. Jogjakarta: Kanisius Publisher
- Cahyono. 2002. *Pisang Budidaya dan Analisis usaha Tani*. Kanisisus: Yogyakarta
- Cavalli-Sforza, L.L. 1997. Genes. Peoples and languanges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94 (15)
- Chen, S., H. Yao., J. Han., Liu C., Song J., Sji L., Zhu Y., Ma X., Gao T dan Pang X. 2010. Validation of The ITS2 region as A Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *Plos One*. 5 (1)

- Damayanti, F. 2007. Analisis Jumlah Kromosom dan Anatomi Stomata pada Beberapa Plasma Nutfah Pisang (*Musa* sp) Asal Kalimantan Timur. *Biosiantie*. 4 (2)
- Darmono, T.W. 1996. Analisis Keanekaragaman Genetik Tanaman Dengan Teknik Molekuler. *Hayati*
- Dasuki, U.A. 1991. *Sistematik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: Pusat Antar Universitas Bidang Ilmu Hayati ITB.
- Davey, M.W., Gudimella R., Hari Krishnanto J. A., Norzulani K., dan Johan K. 2013. A Draft *Musa balbisiana* Genom Sequence for Molecular Genetics in Polyploid, Inter-and intra-specific *Musa* Hybrid. *BioMed Central*. 14
- De Jesus, O.N., S. de Oliveira e Silva., E. P. Amorim, C. F. Ferreira, J. M. S. de Campos, G. de Gapsari Silva, dan A. Figureira. 2013. Genetic Diversity and Population Structure of *Musa* Accessions in ex-situ Conservation. *BMC Plant. Biol.* 13 (41)
- De Langhe, E., L. Vrydaghs, P. 2009. Why Bananas matter: An Introduction to the History of Banana Domestication. *Ethnobot. Res. & Appl.* 7
- Drummond A., J dan Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees. *BMC Biology*. 7 (214)
- Ekasari, T.W.D., A. Retnoningsih dan T. Widiarti. 2012. Analisis Keanekaragaman Kultivar Pisang Menggunakan Penanda PCR-PFLP pada Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA ribosom. *J. MIPA*. 35 (1)
- Espino, R.R.C., S.H. Jamaludin, B. Silayoi dan R.E. Nasution. 1992. *Musa* L. (edible cultivars) dalam Verheij, E.W.M. dan R.E. Coronel (Eds.). *Plant Resources of South-East Asia No.2: Edible fruits and nuts*. Bogor: Prosea Foundation.
- Estabrook, G. 1984. *Phylogenetic Trees and Character-state Trees*. In: *Perspective on the Reconstruction Evolutionary History Cladistics*. Duncan T and T. Stuessy (Eds). Columbia University Press
- FAO. 2016. *Food and Agricultural commodities production* <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fatchiyah, Wirdyarti S., Arumningtyas E, dan Permana S. 2012. *Buku Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler*. Malang: UB Press
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary Trees From DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17
- Finkeldey, R. 2005. Terjemahan Djamhuri E., Siregar Z., Siregar U., J.,

Kertadikara A., W. *Pengantar Genetika Hutan Tropis*.

- Finkeldey, R dan Hattermer, H.H. 2007. Tropical Forest Genetics. Berlin Heidelberg. *Springer Verlag*.
- Firdausi, N., Ari H., Tintrim R. 2015. Studi Etnobotani dan Keragaman Pisang Buah (Musaceae) Pada Masyarakat Tradisional Pandalungan Desa Krai Kecamatan Yosowilangun Kabupaten Lumajang. *BIOSAIN TROPIS (BIOSCIENCE-TROPIC)*. 1 (1)
- Goswami, C., Hossain M.A., Kader H.A., dan Islam R. 2011. Assessment of Physicochemical Properties of Jackfruits' (Artocarpus heterophyllus Lam) pulps. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 15 (3)
- Guindon, S dan O. Gascuel. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 55 (4)
- Gusfield, D. 2001. *Haplotype Inference*. LLC. California: CRC Press
- Guzow-Krzeminska, B., Gorniak M, dan Wegrzyn G. 2001. Molecular Determination keys: Construction of Keys for Species Identification based on restriction fragment length polymorphism. *Int. Arch. Biosci*
- Hall, Barry G. 1942. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How To Manual*. Second Edition. USA: Sinauer Associates
- Hapsari, L. dan A. Masrum. 2011. Keragaman dan karakteristik pisang (*Musa acuminata*) kultivar diploid AA koleksi Kebun Raya Purwodadi. dalam *Prosiding Seminar Nasional HUT Kebun Raya Cibodas ke-159*. 7 April 2011. Kebun Raya Cibodas – LIPI: hal 225-229.
- Hapsari, L. Didik W., Rodiati A. 2015. Genome Identification of Bananas (*Musa L.*) from East Java Indonesia Assessed with PCR-RFLP of The Internal Transcribed Spacers Nuclear Ribosomal DNA. *International Journal of Biosciences*. 7 (3)
- Hapsari, L., D. A. Lestari dan A. Masrum. 2015a. *Album Koleksi Pisang Kebun Raya Purwodadi Seri 1: 2010-2015*. Malang: LIPI-Balai Konservasi Tanaman Kebun Raya Purwodadi.
- Hapsari, L., A. Masrum, dan D. A. Lestari. 2015b. Diversity of bananas (*Musa spp.*) in Madura Island, East Java: exploration and inventory. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 6 (3)
- Hapsari dan Lestari 2016. Fruit Characteristic And Nutrient Values Of Four Indonesian Banana Cultivars (*Musa spp.*) At Different Genomic Groups. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*. 38 (3)

- Hapsari, L., Jean K., Dewi A.L., A. Masrum, W. Lestarini. 2017. Ethnobotanical survey of bananas (Musaceae) in six districts of East Java, Indonesia. *Biodiversitas*. 18 (1)
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid I*. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya
- Hickey dan Peterson R.K. 1978. *Zingiberopsis*, A Fossil Genus Of The Ginger Family From The Late Cretaceous to Early Eocene Sediments Of Western Interior North America. *Canadian Journal of botany*. 56
- Hidayat, T., Yukawa T., Ito M. 2005. Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): Insights from plastid matK and nuclear ribosomal ITS sequences. *J Plant Res*. 18
- Hidayat, T., Kusumawaty D., Kusdianti, Din Y., Agusthina M., dan Mariana D. 2008. Analisis filogenetik molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) menggunakan urutan basa DNA daerah Internal Transcribed Spacer (ITS). *J Matematika & Sains* 13(1)
- Hidayat, T., Pancoro A. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*. 4
- Holder, M., dan P.O. Lewis. 2003. Phylogeny Estimation: Iraditional and Bayesian Approaches. *Nature Reviews Genetics*. 4
- Hsiao, C., Chatterton N.J., Asay K.H., dan Jensen K.B. 1994. Phylogenetic Relationships of Ten Grass Species: An Assessment of Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacer Region in The Nuclear Ribosomal DNA in Monocots. *Genome*. 37
- Huelsenbeck, J.P., dan Ronquist F. 2001. MRBAYES. Byaesian Inference of Phylogenetic Trees. *Bioinformatics*. 17
- Indrawan, M., R. B. Primack dan J. Supriatna. 2007. *Biologi Konservasi*. Jakarta:: Yayasan Obor Indonesia
- INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain). 2006. *Global Conservation Strategy for Musa (Banana and Plantain)*. A consultative document prepared by INIBAP with the collaboration of numerous partners in the *Musa* research and development community. Montpellier, Perancis: International Network for the Improvement of Banana and Plantain.

- IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). 1996. *Descriptors for banana (Musa spp)*. Perancis: International Plant Genetic, Resources Institute Rome Monllier.
- Janssens, Steven B., Filip Vandeloos. 2016. Evolutionary Dynamics And Biogeography of Musaceae Reveal A Correlation Between the Diversification Of The Banana family And The Geological And Climatic History of South The East Asia. *New Phytologist*. 210
- Jazairi, Syaikh Abu Bakar Jabir. 2007. *Tafsir al-Qur'an Al-Aisar Jilid 4*, Ahli Bahasa: Suratman dan Fityan Amali. Jakarta: Darus Sunnah Press
- Jumari dan A. Pudjoarianto. 2000. Kekerabatan Fenetik Kultivar Pisang Di Jawa. *Biologi* 2 (9)
- Kasrina, Anis Z.Q., 2013. Pisang Buah (*Musa Spp*): Keragaman Dan Etnobotaninya Pada Masyarakat Di Desa Sri Kuncoro Kecamatan Pondok Kelapa Kabupaten Bengkulu Tengah. *J.Ind. Tour. Dev. Std.* 1 (2)
- Katsir, Ibnu. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 4 Penj. Abdul Ghofur E.M.* Jakarta : Pustaka Imam Assyafi'i
- Kemenpan. 2016. Outlook. *Komoditas Pertanian Sub Sektor Hortikultura (Pisang)*. Jakarta: Pusat data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian.
- Knowles, L.L., dan W. P. Maddison. 2002. Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology*. 11 (12)
- Koch, M.A., Calonje M., dan Gong W. 2008. Non-coding Nuclear DNA Markers in Phylogenetics Reconstruction. *Plant Syst Evol.* 282
- Lamare, A., Arman M.O., dan Satyawada R.R. 2016. Phylogenetic Implication of the Internal Transcrip Spacer of rDNA and Chloroplast DNA Fragments of *Musa* in Decipherin the Ambiguities Related to the Sectional Clasification of the Genus. *Genet Resour Crop Evol.* 64
- Larkin. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23 (21)
- Li W, Graur D. 1991. *Fundamental of Molecular Evaluation*. Sunderland: Sinauer Associates
- Li, L-F., H.Y. Wang, C. Zhang, X.F. Wang, F.X. Shi W.N. Chen dan X.J. Ge. 2013. Origins and Domestication of Cultivated Banana Inferred From Chloroplast and Nuclear Genes. *Plos One*. 8 (11)
- Li, Lin-Feng, Markk Hakkinen, Yong M.Y., Gang H., Xue J.G. 2010. Molecular phylogeny and sistematics of the banana famili (Musaceae) infered from

- multiple nuklear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to the genus *Musa*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57
- Librado, P., dan Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25
- Liu, A.Z., W.J. Kress dan D.Z. Li. 2010. Phylogenetic analyses of the banana family (Musaceae) based on nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (trnL-F) evidence. *Taxon*. 59 (1)
- Mahalliy, I.J., As-Suyuthi I.J. 1990. Terjemahan Tafsir Jalalain Berikut Asbabun Nuzul. Bandung : Sinar Baru.
- Makful, S., Purnomo dan Sunyoto. 2010. Analisis Keragaman Manggis Menggunakan Teknik AFLP. *J. Hort*. 20 (4)
- Manchester, S.R., dan Kress W.J. 1993. Fossil Bananas (Musaceae): *Ensete oregonense* From The Eocene Of Western North America and Its Phytogeographic Significance. *American Journal of Botany*. 80
- Mandzur, Asy-Syekh Abil Fadl Jamaluddin Muhammad bin Mukrom. 1993. *Lisanul 'Arob*. Bereut Lebanon: Darul Khutub
- Maras, M. 2008. An ITS DNA Sequence-Based Phylogenic Study of Some *Heracleum* L. (Umbelliferae) Species From Turkey's Partial Flora. *Turkish Journal of Biochemistry* . 3 (4)
- McCullough, M.J., K.V Clemons, J.H McCusker, dan D.A Stevens. 1998. Intergenic Transcribed Spacer PCR Ribotyping for Differentiation of *Saccharomyces* species and Interspecific Hybrids. *J. Clin Microbiol*. 36
- Megia. 2005. *Musa* sebagai model genom. *Hayati*. 12 (4)
- Morton, J.F. 1987. *Mangosteen*. In: Fruits of Warm Climates
- Nasution, R.E., dan I. Yamada. 2001. *Pisang-pisang Liar di Indonesia*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi-LIPI. Bogor: Balai Penelitian Botani, Herbarium Bogoriense.
- Nei, M., dan S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press
- Nugroho, E.D., dan Dwi A.R. 2016. *Penuntun Praktikum Bioteknologi*. Sleman: Deepublish
- Nusifera, S. 2007. Metilasi DNA dan Genomic Imprinting (Suatu Tinjauan Tentang Mekanisme Epigenetik). *J. Agron*. 11 (1)

- Nwakanma, D.C., Pillay M., Okoli B.E., dan Tenkouano A. 2003. Sectional Relationships in The Genus *Musa* L. Inferred From The PCR-RFLP of Organelle DNA Sequences. *Theoretical Applied Genetics*. 107
- Nwakanma, D.C., M. Pillay B.E. Okoli dan A. Tenkuano. 2003a. PCR-RFLP of the Ribosom DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Provide Marker for the A and B Genomes in *Musa* L. *Theor. Appl. Genet.* 108
- Osterbauer, N.K., Rehms L. 2002. Detecting Single Seeds of Small Broomrape (*Orobanche minor*) With a Polymerase Chain Reaction. *Plant Health Progress. Penelitian Hayati Edisi Khusus*. 5A
- Pachuau, L., Annupama D.A., Robert T. 2014. Genome Classification of *Musa* Cultivar From Northeast India as Revealed by ITS and IRAP Markers. *Appl Biochem Biotechnol*
- Pemerintah Kabupaten Banyuwangi. (Kondisi Geografis Banyuwangi). 2017. <https://www.banyuwangikab.go.id/> (diunduh 25 Juni 2018)
- Pemerintah Kabupaten Malang. (Kondisi Geografis Malang). 2017. <https://www.malangkab.go.id/> (diunduh 25 Juni 2018)
- Pemerintah Kabupaten Purworejo. (Kondisi Geografis Purworejo). 2017. <https://www.purworejokab.go.id/> (diunduh 25 Juni 2018)
- Pemerintah Kabupaten Bantul. (Kondisi Geografis Bantul). 2017. <https://www.bantulkab.go.id/> (diunduh 25 Juni 2018)
- Pemerintah Kabupaten Sukoharjo. (Kondisi Geografis Sukoharjo). 2017. <https://www.sukoharjokab.go.id/> (diunduh 25 Juni 2018)
- Pemerintah Kabupaten Temanggung. (Kondisi Geografis Temanggung). 2017. <https://www.temanggungkab.go.id/> (diunduh 25 Juni 2018)
- Pemerintah Kabupaten Gunung Kidul. (Kondisi Geografis Gunung Kidul). 2017. <https://www.gunungkidulkab.go.id/> (dilihat 30 Juni 2018)
- Pemerintah DKI Jakarta. (Kondisi Geografis DKI Jakarta). 2017. <https://www.dkijakarta.go.id/> (diunduh 25 Juni 2018)
- Pertiwi, N.P., I.G Mahardika, N.L Watiniassih. 2013. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) Pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochromidae Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekuler. *JURNAL BIOLOGI*. 19 (2)
- Pillay, M., D.C Nwakanma dan A. Tenkuano. 2000. Identification of RAPD Marker Linked to A and B Genomes Squences in *Musa* L. *Genome*. 43 (5)

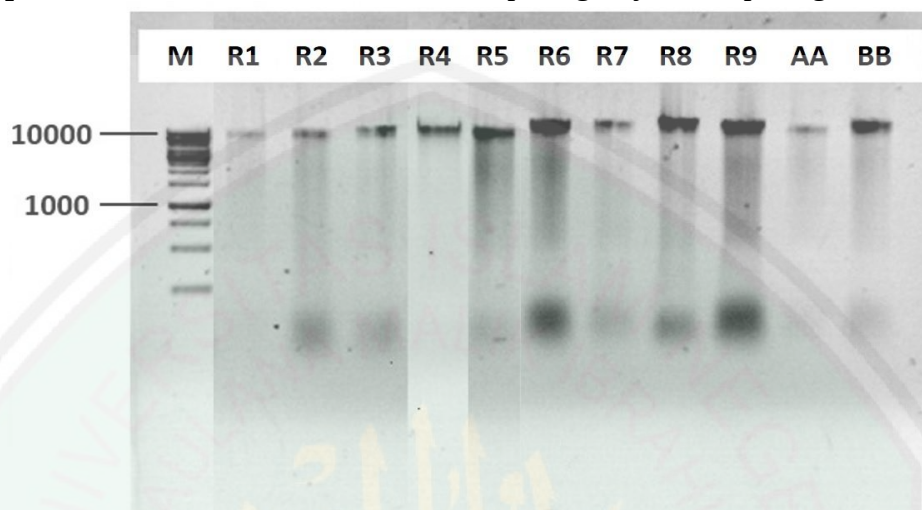
- Posada, D. 2008. jModeltest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25
- Pramita, N.H., Serafinah I, Luchman H. 2013. Etnobotani Upacara Kasada Masyarakat tengger, Di Desa Ngadas, Kecamatan Poncokusumo, Kabupaten Malang.
- Promega. 2010. *Technical Manual: Wizard Genomic DNA Purification Kit: Instructions For Use of Products A1120, A1123, A1125 and A1620*. USA: Madison Wisconsin
- Purwaradia, Hadi, K. 2006. *Issue and Solutionsof Fresh Fruits Export in Indonesia*. Indonesia: Departement of Agricultural Engineering Bogor Agricultur University.
- Retnoningsih, A., Megia R, Rifai M.A., dan Hartana A. 2009. Klatifikasi dan Analisis Filogeni Kultivar Pisang Indonesia Berdasarkan Penanda Molekuler. *Disertasi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Retnoningsih, A., Rita Megia dan Alex Hartana. 2014. Phylogenetic Relationship of Indonesian Banana Cultivars Inferred From trnL-F intergenic Spacer of Chloroplast DNA. *Floribunda*. 4 (8)
- Rimbawanto, A. 2008. Yogyakarta: *Pemuliaan Tanaman dan Ketahanan Penyakit Pada Sengon. Makalah Workshop Penanggulangan Serangan Karat Puru pada Tanaman Sengon*. Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman
- Rukmana, R. 1997. *Usaha Tani Pisang*. Jakarta : Kanisus
- Sambrook, J., Russell D.W. 2001.: *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Ed ke-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- Satuhu, S., dan A. Supriyadi. 1999. *Budidaya Pisang, Pengolahan da Prospek Pasar*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Schaltegger, S., Bestandig U. 2012. *A Guide for Practical Implementtation Handbook* .BMU, Berlin: Corporate Biodiversity Managenment
- Shaw. 2000. Molecular Phylogeography and Cryptic Speciation in The Mosses, *Mielichhoferia Elongata* and *M. mielichhoferiana* (Bryaceae). *Molecular Ecology*. 9
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Volume 13. Jakarta : Lentera Hati
- Siemonsma, J. S., dan Piluek K. 1994. *Plant Resources of South-East Asia No. 8: Vegetables*. Bogor : Prosea Fondation

- Silvia. 2017. Diversity and genetic stability in banana genotypes in a breeding program using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Genetics and Molecular Research* 16 (1)
- Simmonds, N.W. 1959. *Bananas*. New York: Longman Inc
- Simmonds, N.W. dan K. Shepherd. 1955. The taxonomand Origins of The Cultivated Bananas. *Journal of the Linnaean Society (Botany)*. 55
- Simmonds. 1996. Numeric Taxonomy of Wild Bananas (*Musa* sp.). New Phyto I. Spacer PCR Ribotyping For Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids. *J. Clin Microbiol*. 36
- Simpson, Michael G. 1953. Plant Systematic. *Elsevier*. Elsevier Academic Express
- Singh, H.P., Uma S., dan Sathiamoorthy S. 2001. *A tentative key for identification and classification of Indian bananas*. Tiruchirapalli, India: National Research Centre for Banana (NRCB)
- Soltis, D.E., dan Soltis P.S. 1998. Polyploidy: Origins of Species and Genome Evolution. *Trends in EcoL dan Evol*. 14
- Stuessy, T.F. 1990. *Plant Taxonomy. The Systematic Evaluation of Comparative Data*. New York: Columbia University Press.
- Sukartini. 2008. Pengelompokan Aksesori Pisang Menggunakan Karakter Morfologi IPGRI. *J. Hort*. 17 (1)
- Surahman, M, Desta W., Sobir. 2005 .Analisis Kemiripan Kultivar Pisang Indonesia Berdasarkan Pada Penanda Fenotipik. *Stigma*. 8 (1)
- Tamura, K., dan Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10
- Tamura, K., D Peterson, N. Peterson, G Stecher, M. Nei dan S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Bio. Evol*. 28 (10)
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2013. *Product Information Thermo Scientific Dream Taq Green PC Master Mix (2x)*. USA: California
- Tjitrosoepomo, G. 1993. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: UGM Press
- Ubaidillah, R dan H. Sutrisno. 2009. *Pengantar Biosistematik: Teori dan Praktek*. Jakarta: LIPI Press

- Uma S, Siva S.A., Saraswathi M.S., Manickavasagam M, Durai P, Selvarajan R, Sathiamoorthy. 2006. Variation and Intraspecific Relationship in Indian wild *Musa balbisiana* (BB) Population an Evidenced by Random Amplified Polymorphic DNA. *Gen Res Crop Evol.* 53
- Valmayor, R.V., S.H. Jamaluddin, B. Silayoi, S. Kusumo, L.D. Danh, O.C. Pascua dan R.R.C. Espino. 2000. *Banana cultivar names and synonyms in Southeast Asia*. Philippines: International Network for the Improvement of Banana and Plantain – Asia and the Pacific Office
- Verheij, E.W.M., dan R.E. Coronel (Eds.). *Plant Resources of South-East Asia No.2: Edible fruits and nuts*. Bogor: Prosea Foundation.
- White, T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, California, USA: Academic Press,
- Wijayanto, T., Dirvamena B dan Ente L. 2013. Hubungan Kekerbatan Aksesii Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* Formatypica) di Kabupaten Muna Berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda RAPD. *J. Agroteknos.* 3 (3)
- Wong, C., R. Kiew J.P., Loh L.H. Gan O., Seth S.K. Lee dan Y.Y. Gan. 2002. Genetic diversity of the Wild Banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as Evidenced by AFLP. *Ann. Bot.* 88
- Zein dan Musselman L.J. 2004. *The Quranic Talh: Banana or Acacia*
- Zein, S.A dan S. Sulandari. 2008. Keragaman Genetik Ayam ombok Berdasarkan sekuen D-LOOP DNA Mitokondria. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences.* 13 (4)
- Zuhairini, E. 1997. *Budidaya Pisang Raja*. Trubus Agrisarana. Surabaya.
- Zvelebil, M dan Jeremy O., Baum.2008. *Understanding Bioinformatic*. Garland Science: Taylor and Francis group publisher

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Ekstraksi Total DNA 9 pisang Raja dan 2 pisang liar

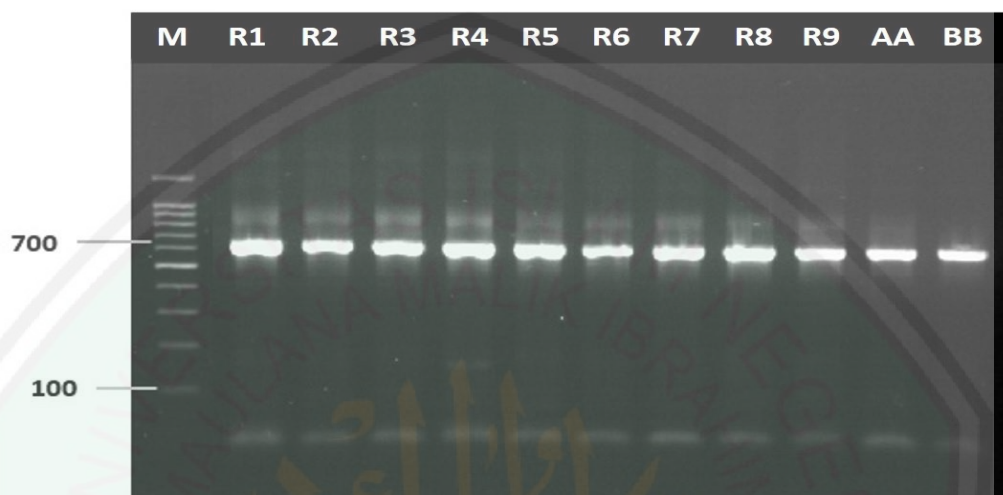


Ket: R1 (Raja Delima); R2 (Raja Sereh); R3 (Raja Kisto); R4 (Raja Bali); R5 (Raja Gareng); R6 (Raja Seribu); R7 (Raja Kutuk); R8 (Raja Brentel); R9 (Raja Lini); AA (*M. acuminata*); BB (*M. balbisiana*)

Lampiran 2. Hasil Kuantitatif kemurnian dan konsentrasi DNA dari 9 sampel pisang Raja dan 2 *outgroup* pisang liar.

No.	Kode	Nama Sampel	$\lambda 260$	$\lambda 280$	260/280	Konsentrasi (ng/ μ L)
1.	R1	Raja Delima	1.19	0.73	1.63	59.68
2.	R2	Raja Sereh	4.36	3.34	1.31	218.05
3.	R3	Raja Kisto	1.33	0.73	1.82	66.44
4.	R4	Raja Bali	2.13	2.16	0.99	106.53
5.	R5	Raja Gareng	1.40	0.70	2.00	70.17
6.	R6	Raja Seribu	2.60	1.09	2.39	130.02
7.	R7	Raja Kutuk	1.15	0.40	2.89	57.67
8.	R8	Raja Brentel	2.87	0.98	2.92	143.30
9.	R9	Raja Lini	2.90	0.71	4.06	144.78
10.	AA	<i>M. acuminata</i>	1.27	0.44	2.90	63.68
11.	BB	<i>M. balbisiana</i>	1.29	0.53	2.43	64.54

Lampiran 3. Hasil Amplifikasi daerah ITS 11 sampel pisang menggunakan primer ITSL dan ITS4



Ket: R1 (Raja Delima); R2 (Raja Sereh); R3 (Raja Kisto); R4 (Raja Bali); R5 (Raja Gareng); R6 (Raja Seribu); R7 (Raja Kutuk); R8 (Raja Brentel); R9 (Raja Lini); AA (*M. acuminata*); BB (*M. balbisiana*)

Lampiran 4. Hasil Sekuensing Raja Delima (R1)

```

ACATCGGGGT  GGCACCTGAC  CTGGGGTCGC  GGTCCGTGGC  ATCGACTCGC  ACCACGACTT  GGGTCCTCGA  GGCTCGCC  GGTCCCGAA  GGCACGACGT  ACGGCTCGCA  CAAGGCATC
ACCACGCGTC  GTGTTTCGACA  ACCACCGACG  GCGCGCTCTT  CGGCCAACCG  CACCTTCCGG  CACGGGGGGG  CCATCCTCCG  CGTTCGCCCC  CACCCCCCGA  CGGAGGGGCG  ACCAACCAAC
CAACGAAAGA  CGGCCACCCA  GGCGGGCCCG  TCCTTAGACG  GACGGGCTCG  GGACTTGCCT  GCATAGAAAC  AATGGATGGC  GGAATGCAGT  CTTTCATTCC  AAGCATGGAA  TTCTTTTACG
TTCTTCATCC  ATGCAAGAGA  CAACCTATAT  ATTGCCTACG  GACATCCAAT  GAAGGGGGCG  ACCGAATGAA  ACCCAGCCTG  CAGCAAGAGG  GGCCTCCACG  CTTGATCGTG  CTGGTTGCTC
GGGGCCTCCC  CGGCCGGGGT  GGGTGATCCA  CCCCCCGAC  CGGCCCGCCG  AAGGACGAAC  CAACTTTGGG  GGGGTTGTGC  GAACCAAGCC  AACCAACAAT  CATTGACGCA  TTCACGGCCG
CCCCGTCAG  TGGGGCTCA  CAAAGATCCT  TCGSCAGGTT  CACCTAAGA  AACCTTGTAA  CAAAAAAGC  G

```

Raja Sereh (R2)

```

CCAACITGCT  GGCACCTGAC  CTGGGGTCGC  GGTCCGTGGC  ATCGACTCGC  ACCACGACTT  GGGTCCTCGA  GGCTCGCC  GGTCCCGAA  GGCACGACGT  ACGGCTCGCA  CAAGGCATC
ACCACGCGTC  GTGTTTCGACA  ACCACCGACG  GCGCGCTCTT  CGGCCAACCG  CACCTTCCGG  CACGGGGGGG  CCATCCTCCG  CGTTCGCCCC  CACCCCCCGA  GGGGGGGAAT  ACCAAGGTC
TAAGAGTGA  GGCCCCCGCA  GGCGTGCGCT  TTTTCGGATG  GGGTCTCGGG  CAACCTTTGT  TCAAAAAGAC  AATGGTTCTC  GGGATTGTGT  AATTACACAC  ACGTATCTCA  TTTTCTCCG
TTCTTTTCT  ATGCGAGAGA  GGAGATATAT  CTTGCCGAGA  GACATCCAAT  GGGGGGGAAC  CCGGAATTGT  ATCCTCCTCG  GTGCGGGGAG  GCGCCCCCAC  ACTGATGTIT  TTGTTTCTT
GGGCTCTCTC  CGCGGGGGGG  GGGGGTTCAT  CCCCCCGTC  GCGCCCGCCG  AGGGGGGACC  SACATTTTGG  GGTGTTGTGG  GGACGAGCCC  CACAAAAAAT  CTTTGACACA  TTCACGCGC
CCCTCCTCAG  GGGGTCTCGA  AAAAGATCCT  TCGCGGGGTT  CACCTACAGA  AACTTTTTTT  AAAAAAA  A

```

Raja Kisto (R3)

```

CCAACCTTGG  GTGCCACTGA  CCGGGGGTCG  GGTCCGTGGC  ATCGACTCGC  CACCACGACT  TGGTCTCTCG  AGGCCTCGCC  CGGGTCCCGA  AGGCACGACG  TACGGCTCGC  ACAAGGCATC
CACCACGCGT  CGTGTTCGACA  AACACCGACG  GCGCGCTCTT  TCGGCCAACG  GCACCTTCCG  GCACGGGGGG  CCACTCCTCG  CGTTCGCCCC  CACCCCCCGA  AAGGGGGGAC  TACGAAAGG
CTAAAAAGTG  AGGCCCGCGC  GGGGGTGTGC  TTTTACGGAT  GGGGTCTCGG  CGGACTTGTG  TTCTAAAACA  CTCTGGGTCT  CGGGATTITG  TGCTTTTACC  CCGGTGTCTC  ATTTTCTCTC
ATTCTTTTTC  TATCGAGAGG  ACGAGATATA  TCTTGTCCAG  AGACTTCCCA  TGGGGGGACC  CCGGAAATGT  TATACTCCTG  TGTGTGAGA  GGGCTCCCA  CACCCATATT  CTTGTGTCTC
GTGGCTCTCT  CGCGGGGGGG  TGGGAGATCA  TCTCCTCTGT  CGCGTCGCAC  GAGGCGGAAC  GACATTCGGG  GGTGTTGTGG  GGGAAAGCCC  CAAAAAATC  GTTACGCAT  TCCGGGTGTC
TCCCGGGGGG  TTGAAAAG  ATCCTTCCGC  AGGTTACCT  ACGGAACCTT  TTTAAAAAA  A

```

Raja Bali (R4)

```

GCTCCTTGTG  GTACCTGTAC  CTGGGGTCGC  GGTCCGTGGC  ATCGACTCGC  ACCACGACTT  GGGTCCTCGA  GGCTCGCC  GGTCCCGAA  GGCACGACGT  ACGGCTCGCA  CAAGGCATC
ACCACGCGTC  GTGTTTCGACA  ACCACCGACG  GCGCGCTCTT  CGGCCAACCG  CACCTTCCGG  AACCGGGGGG  CCTTCTTCG  AGTTCTCTCC  CACCCCCCGA  GGGGGGATCG  ACGAAGCGTC
GAAAGCGTGA  CGGCCAGGCA  GGCGTGCCCT  TAGCCGGATG  GCGTCGGGCG  CAACCTTCCG  TCAAGAGCTC  GATGGTTTAC  GGGGATTCGC  AATTACACAC  AGGTATCGCA  TTTCGCTACG
TTCTTCATCG  ATGCGAGAGG  CGAGATATCC  GTTGCCGAGA  GTCAATCCAAT  GGGGTACCCG  TCGGAATGTG  ATCCTCCTGC  ATGCAAGAGG  GCGCTCCGAC  TTGATGTTTC  GTGTACCTTC
GGGCTCTCCG  CGCGGGGGTT  GGTAGTTTCA  CCCCCTCCGTC  GTCCCGCCCG  AGGGCGGATC  GACATTCGGG  GGTGTTGTGG  ACAAGAGCCA  CAGAGAAGT  CTGAGCATT  TTCGGGGCGC
CCCTCCACAG  GGGGTCTACA  ATAAGACTTT  TCCACGTGCT  CCTATACAAA  CTGTGTTGAC  TAAAAAGG

```

Raja Gareng (R7)

ACAACCTGGC	TGCCCACTG	ACCTGGGGTC	GCGGTCCGTG	GCATCGACTC	GCACCACGAC	TTGGGTCTG	AAGGCTCGC	CGGGTCCCG	AAGGCACGAC	GTACGGCTCG	CACAAGGCAT
CCACCACGCG	TCGTGTTCGA	CAACCACCGA	CGGCCCGGTC	TTCCGCCAAC	CGCACCTTCC	GGCACGGGGG	GCATCTCTCC	CGGTTCGCCC	CCACCCCGCC	CAGGGGGSCA	CCAACAAAC
GCCAAAGCCT	GGAGGCCAAG	CAGGSCGGGC	CCTAACCCGA	AGGCTCCGG	CGGCACTTGC	CTTCCAAAA	TCCATGGGTC	AACGGAATCC	TGCATTCAAA	ACCAGGATTG	CAATTCCCT
CTTCTCTCT	TCATGCCAGA	AGCCAAAAA	TCGTTGGCCA	AAAGCCGTCC	ATGGGGGCAA	CCGCCGAAAT	GGAAGCCCC	TGCTGGCAGG	AGGCGCTTCC	AACTTCATGG	TTGTGGTTC
TGGGGGTTTT	CCCCCGCGG	GTGGGTGGTC	CTTCCCGCCG	TCGGTCCCCC	CGAAGGGGAA	ACCAACTTTC	GGGGGGTGG	CGGAACAACC	CCAACAAGAA	ATCTTTAACG	AATTACGGT
CGCCCTCGCC	GGGGGGCTTC	AACAATAATC	CTTCCGAGG	TTCAACCAACG	AAAACCTTTG	TACCAAAAA	AAGG				

Raja Seribu (R10)

AACACCGGGG	TACCACCTGA	CTGGGGTCCG	CGGTCCGTGG	CATCGACTCG	CACCACGACT	TTGGTCTCTG	AGGCTCGCC	CGGGTCCCGA	AGGCACGACG	TACGGCTCGC	ACAAGGCATG
CACCACGCGT	CGTGTTCGAC	AACCACCGAC	GGCCCGCTCT	TCGGCCAAAC	GCACCTTCCG	GCACGGGGGG	CCATCTCTCG	CGTTCGCCCC	CACCCCGCCC	AAGGGGGGGC	TACGAAAAAG
CCCAAGCGTG	AGGCCCGCG	GGGGGTGGCG	TTTTTCGGAG	GGGGTCTCGC	TTCTAAAAA	CACGTGGGTGG	CGCGGTTTGG	TGCTTTTCAC	CCCGGGTGGC	TTTTTTCTCG	ATTTTTCTCG
ATTCTTTTTC	TATGCGAGAG	AGGAGATATA	TCCTTGCCAG	AGAGATCCCA	TGGGGGAGCC	CCCCGAAAAA	TATACTCCCG	GGTGGGAGGA	GGGCCCGCCA	CACCTCATATT	TTGTGTCTCT
GGACCGCTCC	CCGCGGGGGG	GGGGGGATCA	CCCCCGCGT	CGCGCCCCCG	GAGGGAGAAA	CAAAAATTTG	GGGGTTTGGG	GGGGCGCCCC	ACCCAAAAAT	GTGACCCCTT	CCCGTCGTCC
TGCTGGGGGA	ACCAAAAAAG	TCCTTCGCGAG	TTCACTACGG	AACTTTTTAC	AAAA						

Raja Kutuk (R11)

TCAACCTTGC	TGTCACTGA	CTGGGGTCCG	CGGTCCGTGG	CATCGACTCG	CACCACGACT	TTGGTCTCTA	AGGCTCGCC	CGGGTCCCGA	AGGCACGACG	TACGGCTCGC	ACAAGGCATG
CACCACGCGT	CGTGTTCGAC	AACCACCGAC	GGCCCGCTCT	TCGGCCAAAC	GCACCTTCCG	GCACGGGGGG	CCATCTCTCG	CGTTCGCCCC	CACCCCGCCC	AAGGGGGGGC	TACGAAAAAG
TCCAAAGGT	GGACCCCGAG	GAGGGGTGGC	CCTTACCCGA	AGGCCCGCGG	GGCAAAATTC	GTTTAAAAA	TCCATGGGTT	CCCGAAATTT	GCAAAATACA	CCCAAGATCC	CAATTTCTCT
CCTTTTTTCA	CCAAGCCAGA	AGCCAAAAA	TCCTTGGCCA	AAATCTCTCC	AAGGGGGGAA	CGCGCGAAAT	TTAACCCCC	GGCAGGCAAG	AGGCCCGCCC	AAATCCAAGG	TTGTGGTTC
TGGGGCTTTC	CCCCCGGGG	GTGGGAATTC	CTCCCCCGG	TCCTCCCCCG	CCAAGGGGAA	ACCAACTTTC	GGGGGGTGGC	GGGAAAAACC	CCAAAAAATA	TGTTGAACC	ATTCGCGGG
TGCCCGCCCA	GGGGGGCTCC	ACAATGATCC	TTCCCGAGGG	TCTACTAAAG	AAACTCTTTT	AAAAAAAGG					

Raja Brentel (R12)

CCATTGGGGT	GCCACCTGAC	CTGGGGTCCG	GGTCCGTGGC	ATCGACTCGC	ACCACGACTT	GGTCTCTGAA	GGCTCGCCCC	GGTCCCGAAG	GGCAGCAGCT	ACGGCTCGCA	CAAGGCATCG
ACCACGCGTC	GTGTTTCGACA	ACCACCGACG	GGCCCGCTCT	CGGCCAACCG	CACCTTCCGG	CACGGGGGGC	CATCTCTCGC	ACACGCTCC	ACCCCGCCCG	AGGGGGGCAT	CGCGGAAGCG
TCGAAAGCGT	GAGCCCGAGG	CAGGCGTGCC	CTTAGCCGGA	TGGCTCAGG	CGCAACTTGC	GTTCAAAGAC	TCGATGGTTC	ACGGGATTCT	GCAATTCACA	CCAGGTATCG	CATTTGCTTC
CGTTCTTCAT	CATGTCGAGA	CCCGAGATAT	CCGTTGCCGA	GAGTCATCCA	ATGGGGTCAC	CGTCGGAATT	GTATCTCTCT	GCATGCAAG	AGGCCCTCCG	ACTCCGATGT	TCGTGTACCT
TGGCGCTCTC	CGCGCCGGGG	TTGGTAGTTC	ATCCCTCCCG	TGCTCCCAAC	CGAGGGCGGA	TCGACATCGG	GGTGTGTGCG	GGCAGAGCCC	GACGAGCAAT	CGTTGACGCA	TTCAAGGCTC
TCCTCGTCAG	TGGGTCTCGA	CAATGATCCT	TCGCGAGGTT	CACCTACGGA	AACCTTGTTA	CGAAAAATGG					

Raja Lini (R13)

CCTTTTGGTG	CCAACCTGAC	TGGGGTCCCG	GTCCGTGGCA	TCGACTCGCA	CCACGACTTG	GGTCTCTGAG	GGCTCGCCCC	GGTCCCGAAG	GGCAGCAGCT	ACGGCTCGCA	CAAGGCATCG
CCACGCGTCG	TGTTTCGACAA	CCACCGACGG	CCCGCTCTTC	GGCCAACCGC	ACCTTCCGGC	ACGGGGGAGC	ATCTCTCCCG	TTCCGCCCA	CCCCCGCCCG	GGGGGCAAGC	ACCAAGGCGT
CAAAAGCGGG	ACCCCAAGCG	GGGGGGGCTC	TTACCGGAAG	GGCTCAGGCG	GAAATTTGCT	TTAAAAAACC	CAAGGGGTCA	GGGAATTCGT	AAATTCACAC	CGGGTATCGA	TTTTCGTATA
TTTTTTTCATC	AATGC AAAAC	CCAAAAATACC	CTTTCCCAAA	AGCCTCCAAA	GGGGGTCAAC	GTGGAATTTG	AAACCCCGCG	CAGGCAGAGG	GGCCCTCCAA	TTCCCAATGT	CGGGTCCCTT
GGCGTTTTCC	GGCCCGGGTT	GGGAATTTCA	CCCCCTCGGC	CGCCCCCCCA	AAGGGCAAAC	CAACTTGGGG	GGGGTGGCGG	GAAAAACCCA	AAAAACAATC	CTTAACCAT	TCCGGTTGG
CCCCCGCCGG	GGGAATCCAC	AATGAACCTT	CCCGAGTTTC	ACCTAAGGAA	CCTTTGTTTC	AAAAAGC					

M. acuminata (AA)

CAATTTTGGG	TGCCCACTGA	CTGGGGTCCG	GGTCCGTGGC	ATCGACTCGC	ACCACGACTT	GGTCTCTGAA	GGCTCGCCCC	GGTCCCGAAG	GGCAGCAGCT	ACGGCTCGCA	CAAGGCATCG
ACCACGCGTC	GTGTTTCGACA	ACCACCGACG	GGCCCGCTCT	CGGCCAACCG	CACCTTCCGG	CACGGGGAGC	CATCTCTCGC	GTTCGCCCCC	ACCCCGCCCG	GGGGGCAAGC	ACCAAGGCGT
CAAAAGCGTGA	CGCCCAAGCG	GGGGGGGCTC	TACCGGAGAG	GGCTCAGGCG	CAACTTGGGT	TCAAAAGACTC	GATGGTTCAC	GGGAATTCGT	AAATTCACAC	AGGTATCGCA	TTTTCGTATA
TTCTTTCATCG	ATGCGAGAGC	CGAAATATCC	GTTCGCCAAA	GTGTCCTCAAT	GGGGTCAACG	TCGGAATTTG	AGCCTCTCGC	ATGCAAGCAG	GGCCCTCCAG	TTCCATGTTT	GGGTTCCTTC
GGCTATCTCC	CGCCGGGGTT	GGTAGTTCAT	CCCCCTCGGC	GTCCCGCCCG	AGGGCGAACC	GACATTCGGG	GTGTTGTGCG	GACGAGCCCG	ACGAGCAATC	GTGAGCCCAT	TCCCGGTTGG
CCTCGTCACT	GGGTATCGAC	AATGATCCTT	CCGAGGTTTC	ACCTACGGAA	CCTTTGTTAC	AAAAAGC					

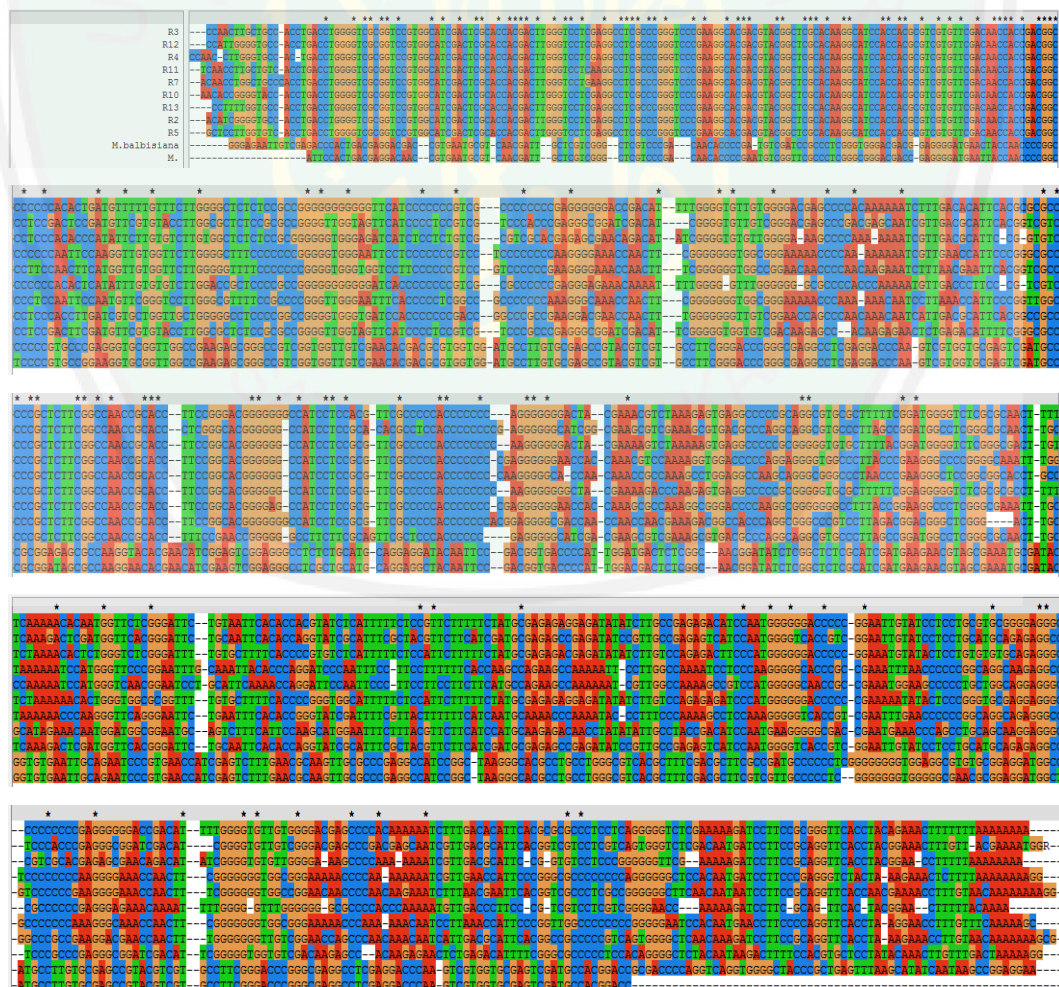
M. balbisiana (BB)

AAGGGGTCCA	CTTTTGGGAC	ATGATGACCT	GTGGTGGGG	TCCGTGGTTC	GAGTCTCACC	ACGACTTGGG	TCTTGGGGG	CGCGCCCGGG	TCCGGGAGGC	ACGAGGTACG	GCTCGCAGAT
GGCATCCACC	GGCGGTGGTG	TTGCAACAAC	ACCGACGGCC	CGCTCTTCGG	CCACCGGAC	CGTGGGGCAC	GGGGGGCCAT	CCTCCGCACA	CGCTCCACCC	CCCCCGAGGG	GGGGCATCGA
CGAAGCGTCA	AAAGCGTGAC	GCCCAAGCAG	CGGTGCCCTT	AGCGGGATGG	TCATCCCAATG	AGGTTCACCT	CGGAATGTGA	ATGGTTCACG	GGATTGTGCA	ATTCAACCCA	GGTATCGAGT
TTCCGTACGT	TCTTCTATCGA	TGCGAGAGCC	GAGATATCCG	TTGCCGAGAG	TCATCCCAATG	GGGTCAACCT	CGGAATGTGA	TCTTCTCGCA	TGCTATAGAG	CCCTCCGACT	CGGATGTTCC
TGTACCTTGG	CGCTCTCGGC	CGCGGGGTTG	GTAGTTCATC	CCCTCCGTGG	TCCCAACCGA	GGCGGGATCG	ACATCGGGGT	GTGTCGGGGA	CGAGCCCGAC	GAGCAATCGT	TGACGCATTC
ACGGAGGTCC	TGGCGAGTGG	GTCTCGACAA	TGATCCTTCC	CGAGGTTACG	CTACGGAAC	CTTGTTACAA					

Lampiran 5. Nilai QV20+ hasil sekuensing

Sampel	QV20+	Panjang Sekuen (bp)	Persentase (%)
R1	307	671	45.75260805
R2	292	668	43.71257485
R3	216	661	32.67776097
R4	509	668	76.19760479
R5	304	674	45.10385757
R6	207	654	31.65137615
R7	306	670	45.67164179
R8	636	669	95.06726457
R9	303	667	45.42728636
AA	513	667	76.91154423
BB	421	671	62.74217586

Lampiran 6. Hasil Alignment menggunakan Clustal X2



Lampiran 7. Kandungan Basa Nukleotida G & C

Sampel	Kandungan Basa				Total
	T (U)	C	A	G	
R1	15.9	35.3	20.6	28.2	592.0
R2	20.9	33.1	17.2	28.7	592.0
R3	22.3	31.5	17.5	28.7	588.0
R4	19.5	33.7	17.5	29.3	590.0
R5	16.4	36.3	20.1	27.2	592.0
R6	19.2	33.8	16.7	30.3	588.0
R7	16.0	37.0	21.1	25.8	592.0
R8	18.6	34.6	16.9	29.9	592.0
R9	17.1	35.5	21.3	26.2	592.0
AA	17.3	29.6	19.3	33.8	585.0
BB	16.9	29.9	18.8	34.5	586.0
Average	18.2	33.7	18.8	29.3	589.9

Lampiran 8. Variasi Genetik (*Singleton*)

Polymorphic Sites
Parsimony informative sites: 385
Singleton variable sites (two variants): 39
Site positions: 1 2 3 51 87 89 109 122 163 164 165 173 176 196 220 240 259 261 278 287 308 311 315 361 387 398 430 447 485 488 502 520 536 556 557 564 566 579 604
Parsimony informative sites (two variants): 220
Site positions: 5 6 7 8 10 13 16 19 20 24 26 27 29 30 33 36 41 46 49 52 53 61 64 66 71 73 74 75 77 82 83 84 88 93 95 96 99 101 102 103 106 112 113 115 117 119 120 123 128 130 131 136 139 140 142 143 146 148 150 151 153 157 160 161 162 167 168 169 172 179 185 186 187 189 190 191 193 197 200 201 202 203 209 213 222 224 230 233 234 239 241 243 244 246 248 253 256 257 258 260 267 270 272 274 275 276 277 284 285 294 296 297 301 306 314 316 318 326 327 329 332 333 336 339 342 344 345 346 350 351 355 356 357 358 359 362 365 366 368 370 371 372 374 376 381 383 385 386 389 391 394 396 399 417 419 420 425 428 431 441 442 446 449 450 452 453 456 458 462 466 468 471 472 473 477 480 481 484 486 489 491 493 494 495 497 499 501 503 508 509 511 514 515 525 527 528 529 532 533 534 538 539 546 547 551 555 559 563 573 576 580 581 582 587 591 592 595 599 600 601
Singleton variable sites (three variants): 8
Site positions: 18 100 141 152 235 322 402 526
Parsimony informative sites (three variants): 145
Site positions: 166 178 180 183 194 195 210 215 216 219 223 227 228 229 232 236 242 245 247 249 250 254 255 262 263 264 265 269 271 273 283 289 290 292 293 295 299 300 302 303 304 307 309 313 317 323 325 328 331 334 335 340 341 343 347 349 353 364 369 373 375 378 379 380 384 388 390 392 393 397 401 403 405 406 408 409 410 411 413 421 422 423 424 427 432 433 434 435 436 438 439 440 443 454 455 457 460 464 465 469 470 475 476 478 479 482 483 487 500 504 505 506 510 513 518 519 523 524 531 535 537 540 544 545 552 553 554 558 561 562 565 567 570 572 574 583 584 585 586 588 589 597 602 603 605
Singleton variable sites (four variants): 0
Parsimony informative sites (four variants): 20
Site positions: 226 231 288 310 321 324 330 337 338 363 377 395 414 426 429 461 498 522 578 594

Haplotype/DNA Sequences Data File

Input Data File: D:\...vacu & bal yes potong fix.fas
 Number of sequences: 11 Number of sequences used: 11
 Selected region: 1-605 Number of sites: 605
 Total number of sites (excluding sites with gaps / missing data): 558

Sites with alignment gaps: not considered
 Number of variable sites: 432

===== Haplotype Distribution =====
 Number of haplotypes, h: 11
 Haplotype diversity, Hd: 1.0000

Hap_1:	1	[1]
Hap_2:	1	[2]
Hap_3:	1	[3]
Hap_4:	1	[4]
Hap_5:	1	[5]
Hap_6:	1	[6]
Hap_7:	1	[7]
Hap_8:	1	[8]
Hap_9:	1	[9]
Hap_10:	1	[10]
Hap_11:	1	[11]

Hap_1:	1	[Raja_Sereh]
Hap_2:	1	[Raja_Brentel]
Hap_3:	1	[Raja_Kisto]
Hap_4:	1	[Raja_Kutuk]
Hap_5:	1	[Raja_Gareng]
Hap_6:	1	[Raja_Seribu]
Hap_7:	1	[Raja_Lini]
Hap_8:	1	[Raja_Delima]
Hap_9:	1	[Raja_Bali]
Hap_10:	1	[M._balbisiana]
Hap_11:	1	[M._acuminata]



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Lutfiana Hasanah Gusmiati
NIM : 14620018
Program Studi : Biologi
Semester : VIII TA. 2018
Pembimbing : Didik Wahyudi, M. Si
Judul Skripsi : Dinamika Evolusi dan Filogeografi Pisang Raja (*Musa spp.*) di Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta Berdasarkan Daerah ITS

No	Tanggal Uraian	Materi Konsultasi	Ttd.
1.	28 Maret 2018	Konsultasi Penelitaian (wet-lab)	
2.	5 April 2018	Konsultasi hasil isolasi DNA	
3.	11 April 2018	Konsultasi hasil amplifikasi PCR	
4.	13 April 2018	Pengulangan sampel untuk Primer yang tidak ada	
5.	25 April 2018	Konsultasi <i>sequencing</i> (pengepakan)	
6.	1 Mei 2018	Konsultasi hasil sekuensing	
7.	7 Mei 2018	Konsultasi pembahasan elfo dan amplifikasi	
8.	11 Mei 2018	Pembahasan sekuensing	
9.	20 Mei 2018	Pembahasan Haplotipe	
10.	27 Mei 2018	Pembahasan QV dan distance	
11.	2 Juni 2018	Konsultasi naskah	

Malang, 26 Juni 2018

Pembimbing Skripsi,

Didik Wahyudi, M. Si
NIP. 198601022018011001



Ketua Jurusan,

Romaidi, M. Si., D. Sc
NIP. 19810201 200901 1 019



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : Lutfiana Hasanah Gusmiati
NIM : 14620018
Program Studi : Biologi
Semester : VIII
Pembimbing : Didik Wahyudi, M. Si
Judul Skripsi : Dinamika Evolusi dan Filogeografi Pisang Raja (*Musa spp.*) di Jawa Timur, Jawa Tengah dan Jakarta Berdasarkan Daerah ITS

No	Tanggal Uraian	Materi Konsultasi	Ttd.
1.	6 Juni 2018	Konsultasi Pembahasan Integrasi Ayat	

Malang, 26 Juni 2018

Pembimbing Skripsi,

Umaiatus Syarifah, M. A
NIP. 198209252009012005

Ketua Jurusan,

Romaidi, M. Si., D. Sc
NIP. 19810201 200901 1 019