

LAPORAN TEKNIS 2016

46/AIR 3/OT 02 02/01/2017

GALUR MUTAN HARAPAN PISANG

Ishak, Jumjunidang, Yulidar, Anisiyah



**PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
2017**

LAPORAN TEKNIS 2016

46/AIR 3/OT 02 02/01/2017

GALUR MUTAN HARAPAN PISANG

Ishak, Jumjunidang, Yulidar, Anisiyah

Mengetahui/Menyetujui

Kepala Bidang Pertanian



Dr. Irawan Sugoro, M.Si
NIP. 19761018 200012 1 001

Kepala Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi



Totti Tjiptosumirat
NIP. 19630830 198803 1 002

Data Riset Galur Mutan Pisang

Pemulia : Ishak

Peneliti : Dra. Jumjunidang, MSi

Teknisi : Anisiyah dan Yulidar

Abstrak

Hasil penelitian pada tahun 2016 sudah menghasilkan data riset galur mutan pisang merupakan kelanjutan dari penelitian tahun 2015. Data riset hasil penelitian meliputi Perbanyakkan enam galur mutan pisang yang terpilih dilakukan dengan kultur jaringan di dua laboratorium yaitu laboratorium kultur jaringan Pemuliaan tanaman pada Pusat Aplikasi Isotop dan Laboratorium Biotrop di Bogor. Disamping itu dilakukan juga analisis Molekular galur mutan Br.09, Br.10, Br.11, Br.13, Br.23, dan Br.25. Identifikasi dan karakterisasi molekular dilakukan dengan teknik PCR dengan menggunakan primer PAL/PAR, PCL/PDR, PCL/PAR, OPA02, OPA03, Scau101, SCAR, dan P21. Semua primer yang digunakan terkait dengan ketahanan penyakit layu Fusarium pada tanaman pisang. Hasil Uji penyakit ketahanan terhadap penyakit layu Fusarium menunjukkan bahwa galur mutan pisang tolerance terhadap Penyakit layu Fusarium RAS 4. Hasil analisis dan identifikasi molekular DNA genom menunjukkan bahwa diperoleh spesifik fragment terutama pada galur mutan Br13.

Pendahuluan

Pemuliaan tanaman pisang sangat sulit dilakukan dengan persilangan (generative) karena sebagian besar tanaman pisang adalah triploid dan Parthenocarp yaitu tidak menghasilkan biji (Robinson, 1996). Pada umumnya perbanyakan tanaman pisang dilakukan melalui perbanyakan vegetative yaitu melalui anakan (*sucker*) atau dengan kultur jaringan.

Kendala utama perkebunan tanaman pisang secara luas di Indonesia adalah gangguan biotik yaitu penyakit yang disebabkan oleh jamur (*Fusarium oxysporum f.sp cubense* (FOC) (Robinson, 1996) dan penyakit bunchy top virus yang menyebabkan tanaman pisang tumbuh kerdil (Hooks dkk, 2008). Menurut laporan Ploetz 2006 bahwa penyakit layu tanaman yang disebabkan oleh *Fusarium* telah menghancurkan perkebunan pisang di berbagai belahan dunia dan pertama kali penyakit ini menyerang perkebunan pisang di Panama yang telah menghancurkan ribuan hektar tanaman pisang sejenis yaitu kultivar pisang *Gros Michel* yaitu sejenis pisang ambon yang mempunyai konstitusi genom AAA mirip dengan barangan dan Cavendish. Jenis *Fusarium* yang menyerang tanaman pisang tersebut adalah sejenis Ras 1 (Ploetz, 2006) ,termasuk Indonesia (Jumjunidang, 2012). *Fusarium oxysporum cubense* disebut juga soil born disease karena jamur ini hidup pada tanah. Diketahui ada empat jenis ras *Fusarium* yang sudah diketahui menyerang tanaman pisang. Ras 4 terutama menyerang tanaman pisang Cavendish yang mempunyai konstitusi genom AAA seperti :pisang Ambon, pisang barangan, pisang Cavendish. Ketiga jenis pisang tersebut disebut juga *desert banana* yaitu pisang enak untuk dimakan langsung tanpa diolah terlebih dahulu. Pisang dengan genom AAA mempunyai nilai ekonomi tinggi, oleh karena itu harus dicari varietas baru yang toleran terhadap penyakit layu yang disebabkan oleh *Fusarium*, sehingga kalau diperoleh varietas baru toleran *Fusarium* bisa dikembangkan untuk perkebunan besar atau oleh para petani tradisional untuk meningkatkan pendapatan mereka. Dua pendekatan yang dapat dilakukan dalam pemuliaan tanaman pisang saat ini adalah melalui *genetic engineering* dan pemuliaan mutasi. Pemuliaan dengan *genetic engineering* atau disebut juga dengan rekayasa *genetic* memerlukan

kualitas sumber daya manusia yang berkualitas tinggi dan peralatan yang canggih serta biaya yang mahal untuk Negara yang sedang berkembang seperti Indonesia. Pilihan lain adalah menggunakan pendekatan pemuliaan mutasi dengan menggunakan iradiasi gamma. Fungsi iradiasi gamma dalam pemuliaan tanaman adalah menciptakan keragaman genetik melalui proses mutasi yang terjadi pada genom tanaman. Iradiasi gamma pada dosis tertentu (20-30 Gy) dapat terjadinya mutasi pada sel tanaman. Mutasi akibat perlakuan iradiasi gamma biasanya adalah poin mutasi disebut dengan mutasi titik yaitu terjadinya perubahan basa DNA bisa dalam bentuk delesi, transversi, atau insersi (xx).

Identifikasi dan karakterisasi molekular tentang ketahanan penyakit layu Fusarium pada tanaman pisang belum begitu mapan, oleh karena rumitnya mekanisme ketahanan penyakit yang disebabkan oleh jamur Fusarium. Beberapa jenis primer sudah dikembangkan oleh peneliti (Chen, et al. 2013; Javed et al. 2004; Dita et al. 2010). Tetapi hasil PCR dari penggunaan primer ini belum bisa menjelaskan secara tuntas hubungan hasil transkripsi dan peranannya dalam ketahanan penyakit layu Fusarium. Penggunaan mutan yang toleran Fusarium dalam identifikasi dan karakterisasi molekular mungkin akan bisa memberikan pengertian yang mendalam tentang hubungan mutasi dengan ketahanan terhadap penyakit layu Fusarium. Karena mutasi akan meubah struktur genetik dari sifat asalnya yang disebabkan oleh perlakuan zat mutagen fisika maupun kimia.

BahandanMetode

Pemeliharaan Plasma nutfah galur mutan pisang di lapang

Dua puluh enam galur mutan tanaman pisang ambon kuning di tanam di kebun percobaan tanaman pisang di kebun percobaan PasarJumat, Jakarta Selatan, koleksi plasma nutfah galur mutan tanaman pisang ini dipelihara secara berkesinambungan agar ketersediaan plasma nutfah untuk penelitian dan perbanyak tanaman tidak terganggu. Pemupukan dan perbanyak dari *sucker* dilakukan secara berkelanjutan

Perbanyakan tanaman

Perbanyakan tanaman dilakukan di dua laboratorium kultur jaringan yaitu laboratorium kultur jaringan Biotrop, Bogor dan laboratorium kultur jaringan pemuliaan tanaman Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Jakarta

Enam galur mutan pisang Br.09, Br10, Br.11, Br.13, Br17, Br.23, Br.25 dan dua tanaman control yaitu tanaman peka dan tanaman toleran dipilih untuk perbanyakan dengan teknik kultur jaringan. Media perbanyakan tanaman menggunakan media Murashige and Skoog's (MS) (1962) terdiri dari: unsur makro: dan unsur mikro menurut MS (Murashige and Skoog, 1962) dengan modifikasi vitamin yaitu: pyridoxin.HCl 0,5 mg/l, thiamin HCl 0,5 mg/l, hormone BAP 5 mg/l dan IAA 0.5 mg/l

Shoot-tip tanaman sebagai sumber eksplan diinduksi dari bongkol tanaman pisang yang diambil dari kebun percobaan. Bongkol tanaman yang mempunyai titik tumbuh dibersihkan dari tanah yang melekat kemudian dicuci dengan air kran. Bongkol kemudian ditanam dalam ember untuk pertumbuhan tunas-tunas baru. Setelah tanaman berumur 1 bulan kemudian diambil sebagai sumber eksplan. Bongkol tanaman berukuran sekitar 3 cm disterilkan menggunakan Natrium hypochlorite dengan final konsentrasi 0.1% dalam aquades steril untuk selama 20 menit. Setelah itu bongkol tersebut dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali dan dikultur dalam media MS seperti di atas untuk menginduksi shoot tip. Setelah dua bulan terlihat tunas mulai tumbuh disekitar bongkol tanaman tersebut

Analisis Molekular galur mutan dan tanaman Kontrol

Polymerase Chain Reaction (PCR) dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis primer seperti tercantum dalam Tabel 1. Sekitar 200 mg daun setiap galur mutan yang terpilih dan dua tanaman kontrol di isolasi DNA menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh Doyle and Doyle cit. Mahdi, et al (1993). Kedalam lumping porselin ditambahkan sekitar 1 ml larutan buffer CTAB kemudian daun digerus sampai halus setelah itu dipindahkedalam "centrifuge tube" berukuran 10 ml. Kedalam tabung ditambahkan bufer CTAB sebanyak 4 ml kemudian digoyang secara perlahan-lahan sehingga tercampur sempurna antara bufer dengan sampel, setelah itu ditambah *equal volume* larutan campuran Chloroform dan Isoamylalcohol dengan perbandingan (24:1) kedalam tabung dan goyang secara perlahan-lahan, setelah tercampur sempurna kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm dengan suhu 15 °C selama 10 menit. Supernatant diambil dan dipindah ke dalam tabung baru, setelah itu ditambahkan 2 volume isopropanol dan digoyang sampai tercampur sempurna, kemudian dinginkan selama 2 jam di dalam freezer. Larutan disentrifugasi selama 10 menit, setelah itu supernatan dibuang dan pelet dibilas dengan alkohol absolut kemudian dikeringkan. Pelet DNA dilarutkan dengan "PCR water" sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke eppendorf tube untuk digunakan selanjutnya.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi PCR dilakukan dalam microtube berukuran 200 ul, Kedalam setiap tabung PCR dimasukkan : Taq DNA mix. 25 µl, template DNA 20µl, dan primer 0.5 µm dengan total volume 50 µl. Suhu pemanasan dilakukan 94oC selama 4 menit, kemudian masuk siklus reaksi PCR dengan suhu denaturasi 94oC selama 40 detik, annealing pada suhu 45oC selama 1 menit, suhu ekstensi 72°C selama 1 menit. Jumlah siklus reaksi adalah 45 siklus kemudian pendinginan pada suhu 27°C.

Agarose gel electrophoresis

Hasil reaksi PCR dilakukan elektroforesis menggunakan agarose dengan konsentrasi 1.5% dalam bufer Tris Asetat EDTA (TAE).

Hasil Penelitian

Perbanyakan galur mutan pisang dilakukan di Laboratorium Kultur jaringan Biologi tropik (Biotrop) dan Laboratorium kultur jaringan pemuliaan tanaman pisang. Hasil perbanyakan tanaman pisang dapat dilihat pada Tabel 1. Plantlet galur mutan Br.13, Br.17 dan Br. 17 sudah mencapai 1500 plantlet tanaman pisang. Saat ini sedang diperbanyak juga tiga galur mutan yaitu: Br.09, Br.10 dan Br.25. Perbanyakan tanaman secara kultur *in-vitro* dapat dilihat pada gambar 1. Tanaman yang ada didalam botol pada tahap perbanyakan. Shoot-tip yang sudah berkembang kemudian dipisahkan menjadi individual sehingga berkembang menjadi plantlet utuh. Sedangkan untuk perakaran plantlet akan dipindahkan ke media MS yang mengandung Indole butiric acid (IBA) dengan konsentrasi 5 mg/l. Selain perbanyakan galur mutan pisang ambon kuning, juga dilakukan membuat galur mutan baru dari pisang barangan dan Cavendish (grain nine) dengan dosis iradiasi berkisar 10-30 krad. Hasil sementara hasil penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1, kultur *in vitro* pisang barangan dan *Cavendish* baru mencapai pada generasi M1V2.

Analisis molekular galur mutan pisang dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis primer yang terkait dengan ketahanan penyakit layu Fusarium (Tabel 2.). Primer PAL/PAR, PCL/PDR, dan PCL/PCR, adalah berasal dari publikasi Chen et al.(2013). Primer ini mengamplifikasi genom Fusarium yang berhubungan dengan ras 4. Penggunaan primer ini pada genom tanaman pisang menghasilkan DNA fragmen berkisar antara 150 -700 bp (gambar. Primer PCL/PDR pada galur mutan Br.13 menghasil polymorphic fragment 400 dan 700 bp dan DNA fragmen ini tidak ditemukan pada galur mutan lain. Sedangkan primer ScauS0901 diperoleh spesifik

DNA fragmen 500 bp untuk Br13.

Tabel 1. Hasil Uji VCG galur mutan pisang di KP. Pasar Jumat, Jakarta Selatan

No.	Compatibilitas (Isolate) hasil VCG pada Tanaman Peka	Tropical RAS Fusarium (Foc)	Sampel yang di uji dan terserang penyakit
1	01213/16	Ras 4 (TR4)	BRO
2	01213/16	Ras 4 (TR4)	BSF1
3	01213/16	Ras 4 (TR4)	BR22
5	01213/16	Ras 4 (TR4)	BSF4
6	Nit Mutan tidak ada	-	BR12
7	01213/16	Ras 4 (TR4)	BSF2
8	Nit mutan tidak ada	-	BR.11
9	01213/16	Ras 4 (TR4)	BR3

Tabel2. Primer yang digunakan dalam identifikasi galur mutan ambon kuning di laboratorium DNA Pemuliaan tanaman

Primer pisang untuk tolerance Fusarium

Sumber: Chen, et al. (2013), Plant Pathology (2013)42:112-119)

Asif, JM. , et al. (2004), Biol. Plantarum 48

Dita, et al. (2010), Plant pathology 59

Primer	Sequences (5' >>>>> 3')	Race	Fragment
PAL	CTTGACAAGGCACAGACACACAAG=26	R1/R4	408/500
PAR	CGCATGACCTGGAATGAGTTGCTA=24		
PCL	GGCCTGCACTGTATACTGAA=22	R4	815
PCR	TAGTAGGTGACCTAGTCAGCTAGC=24		
PCL	GGCCTGCACTGTATACTGAA=22	R4	697
PDR	TCAACCTTCTCGCCATCAACTC		
	Wang, et al. (2012) Mol.Biol.Rep		
SCaS0901	CAGGGGATGTATGAGGAGGCT	R4	
	GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC		
Scau1001	ACCGGGTAATTCCACT	R4	
	CCTGAGTTGGAGACC		
OPA03 OPA02	AGTCAGCCAC		400 bp in susceptible plant
	Asif, JM., et al. (2004), Biologia Plantarum 48 (2004)		
P21	CGCTGCCTT		700 bp, resistant plant
P24	GTGCGTATGG		300 bp, susceptible plant
D1	CAGGGGATGTATGAGGGCT (F) GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC (R)	R4	242 BP
	TTTGCTCAATCTTTCATCCAACAG (F) CTTATAGTTGACGATTT GTC(R)		Gene name; RGC5 Taxonomic identifier:214687 (NCBI), 2008



Gambar 1. Uji observasi galur mutan pisang Br.11 untuk persiapan pelepasan varietas baru. Tanggal tanam pada bulan september 2016

Data DNA sekuens galur mutan pisang dan tanaman kontrol

Br.09 (Primer PCR.R)

```
>160419-R6_E12_PCR-1_PCR_R.ab1      480
GACTCCTTTTATCCAGCGCGCCCTACGTACGCGCCACCAAATTACAAATC
TCAAAAACAGGCCAAAATATTTAATCTGTTTCTTTTCTTTTATTTAC
TCCCCCTACTCCCCCAAAAACCTCCTCTCTCAACTATACCTCCTT
CCCCCTCCCTCTCCACTTCCCCCCTTACTTTCCTACTCTTCCTTTT
TCTTTTCTCTTTCTTTTATTTTCTCCCCCTTTTCTATTCA
TTCTTCTTACTTTTTTTTTCTTATTTTCTTTCTTTTTTTTTTT
TTCTTTTTTATCTTTTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTTTTTTTT
TTTTTATTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTATTTTCTTTCCCAATT
TTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTATTTATATCTTTAATATTTATTTT
TACTATTTTTTATTTTTTTTTCTATT
```

Br.10 (Primer PCR.R)

```
>160419-R6_G12_PCR-2_PCR_R.ab1      515
NGCCCCATCTCTTTCTTACAATTGCTGCAAGTCTCACATCGCCGCAACA
AAACATTCTCAAACACCCAATTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCTTTT
TTTTCTTTTTCTTACCCTCTCCCTCACATAATCCCCCTTTTCTTTT
CTTTTATATCTTTTTTCCCTCCCCACTCCATATCCCAACCCTTATCT
TTCCCTCCTCCATTCCCTACTCCTTCTCTATCCCTTTCTTTTTCTCC
CTCCCTTAAAATACATATCAATTCATTTTACTTTTAATTTTTCTCATA
ATTTCTTTCTTCTTTCAATACAACATATACTTATACCACTTTTTTT
TTATCTTATATTCCTATTTCAITTTATTTTTTTTCACTTACTCTTATA
TTATTTCTCCTCTTATATTTTTTTTTATTTATTTTTTAAATTTA
```


TTTTTTTTACCAATTTAACATATATTTTAAATTTCTAATTTCTTTATTT
TTTTTTTTCTTTTC

Br.13 (Primer PCR.R)

160415-02_L22_PCR-3_PCR_R.ab1 626

NNAGTNNNCNNCNTATNNTNAAGTCAGTGTATACAGTGCAGGCCAAGAA
TGAGCATGTTTGAAGGTTTGGCGCAAGTCAGCGTGCCGTCCCTAAAGCA
TCATCCCCTAAGCCTCCACATCCCTAAATGTCGACTGAGCTAAAAAAGG
TGCCCGGAAAAGGTGAAGAGTCGGGTAAGCTCACGTGATGTTCCCGGCG
TAGGGTCATTACCTGCAAGTAGTTTTGATTTTTTTTTGTGCGGTTGCGTT
TGAAGAACCTTCTGGTGTGCTTATTTATTTATCTTTGGTTTGATGTGTTG
TTTTATTAAGATCTTCTTTGGTTTTGTCGTATTGTGTTGTTTTATT
TTGCTGATCCTTTAGTTTTGTTTTGTTATTGTTTGAATCTAACTT
GTTACTTATCAAAATGATCATCTATTTGTTTTTTTTTTTTTTGTTGTTG
TTTTATTGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTATTTTTGATTTTTTTTTTTTT
TTTTATCATTTTTGTTTTATTTTTATTTATGTTTAAATTTAAAAGT
ATTTTTATTTTTAAGTATTTTTATTTTTATTTTTATCTTTTTAA
TTATTTTATTTTTAAAATTTTTTTTT

Br.23 (Primer PCR.R)

160415-02_M22_PCR-4_PCR_R.ab1 346

CNNNNCTCTNTTGNNGNNGNNTNANTGGGCTTGCCGTGCTCAAGCCC
TTTGTCTGGCTTAGCTTGGTTGCCCAAGGCGGGCGCACCCCTTGCCTGAC
CCCCATAAAGGTCGCCTCCCCGAAGCCTCATACATCCCTGAAGGCGCGG
GTGTTCTGTTGACTTGCTTTTTGTTGTGTTTTCTGTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTCTTCTTGTATTTTTTTTTTTTTTAAATTTT
TTAATTTTTTTTTATTTGCTGGTGGTTTTTTTTTTTTAGTTGTTTTAT
TTGTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGTTGTAGTTGGG

BSF (Primer PCR.R)

>160415-02_O22_PCR-6_PCR_R.ab1 680

ANNNTAAATNGTTAANCTGNCTNNNTTGGGTATGGTTTTACGCCTATT
GCTTCTTTTAGTACCTATGTCGAATAGCACTTTATGACTTCCGTTATTTT
CCGAAACAACCAAAAATCCCAAAGAAAAGGGGGCGATCCTTTGTAAT
ACTGGTGTGTCTACGTTGACTAATTTCTTTTATTGTTTTATGCTCACTG
CCTTAAGTCTTCCGAAATCTGTAGTGCCATTTGAATTAATGAATCTTT
CAACGCGCGGTGAGAGGCGGTTTGTATTTGTGTTTCTCCGCTTCCCT
GCTCTGACTCGCTGCGCTCTTTTTCTGCTGCTTAGCGGTATTTTT
TCAATTTATGGCTTAAATACAGTTATCTACAGTTTCATGGTAATTTCAAT
ATTTAACATGTTATCTATAGGCCATTAATGGTCATGTTTTTTATATTG
GTCATGTTGCTGGCGTTTTCCATTTGCTTTTTTTTTGACTATTTTT
TTAATATCTTCTTTTTTATGTATTTAAACTTTACAGGACTATAAAGA
TCTATGTTTTCTCTAGTTTTTTTTGTGCGTTTTCTTTGTTCTATC
CTGCTGCTACCGGATACTTGTCTGTTTTCTTCTCGGGAAGTGTGTG
CTTTTTCTCAAATTTTTTTTTTTTTTTTT

BRK (Primer PCR.R)

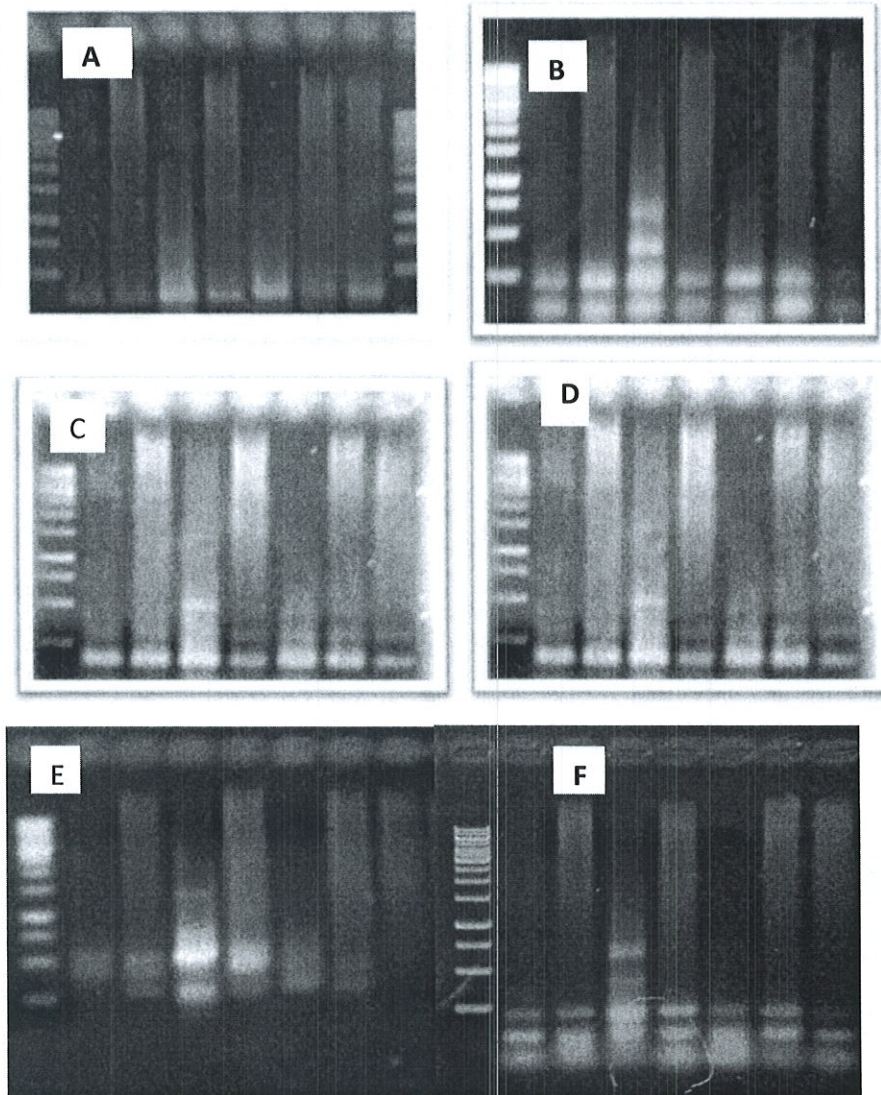
160415-02_P22_PCR-7_PCR_R.ab1 368

GNNNNCCANNNNNNNGAATNNNTTGGTGGCGCTAAAGCGTACACCCAA
CTATGATAGCTACCTAGGCGATTAGCTCCTTTTGGGCGTCCAATAATTT
CATTACCGGGTAATTACATGTCAGAAATAATGAATGACTGTTTACCTAAC
TGTCTTTTCTCCTGGTGGTTAGGTTGTTTCTGCTGGCGAGTCTTGAT
TTGCTTTTGTCTTAAAGTTTTGCTTCTTATATGTAGGTTTTTTGTT
ACATCTTTTTGTTCTTTTTTTTTAATGGTTGAGTTTTTTGTTTTTTT
TTAATTTTTAAATTTTTTTTTTTTTGGTTTTTTTTTTTTATTTTTTTG
TTTTATTTTTTTTTTTT

Gambar 2. DNA sekuens dari galur mutan Br.09, Br.10, Br.13, Br.23, Br.25, tanaman pisang pka Fusarium dan tanaman kontrol toleran terhadap Fusarium

M 1 2 3 4 5 6 7

M 1 2 3 4 5 6 7



Gambar 1A-F: Hasil agarose gel electrophoresis dari produk PCR menggunakan primer PAL/PAR (A), primer PCL/PDR (B), ScaS0901 (C), primer OPA03, (E) dan primer PCL/PCR (F)

Keterangan : M, DNA marker; Lajur 1, Br09; Lajur 2, Br10; lajur 3, Br13; lajur 4, Br23; lajur 5, Br25; lajur 6, kontrol peka, lajur 7 kontrol tahan.

Daftar Pustaka

1. Asif, J.M, Chai, M., and Othman, R.Y., (2004) Study of resistance of *Musa acuminata* to *Fusarium oxysporum* using RAPD marker, *Biologia Plantarum* 48:93
2. Asif, J.M., and Othman, R.Y. (2005) Characterization of *Fusarium* wilt-resistant and *Fusarium* susceptible somaclonal of banana cultivars Rastali (*Musa AAB*) by random amplified polymorphic DNA and retrotransposon markers, *Plant Molecular Biology Reporter* 23:241
3. Chen, Y.F., Chen, W., Huang, X., et al. (2013) *Fusarium* wilt resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a microcross-section cultural system, *Plant Pathology* 62:112
4. Hooks CRR., Wright, MG., Kabasawa, DS., Manandhar, R. And Almeida, RPP. (2008) Effect of banana bunchytop virus infection on Morphology and growth Characteristics of banana, *Annals of applied biology* 153:1-9
5. Hwang, S.C. and Ko, W.H. (2004) Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan, *Plant disease* 88:580
6. Jumjunidang, Edison, Riska, dan Hermanto C. (2012) Penyakit layu *Fusarium* pada Tanaman Pisang di Provinsi NAD: sebaran dan identifikasi Isolat Berdasarkan Analisis Vegetatif Compatibility Group. *Hort.* 22:164-171
7. Li, X-S., Bai, T., Li Y.F., Ruan, X., and Li, H. (2013) Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense tropical race 4-inoculated to *Fusarium* wilts in banana root cells, *Proteome science* 11:41 (<http://www.proteomesci.com/content/11/1/41>)

8. Mahdi, J.M., Retno, A., and Ishak (2013) Determination of Phylogenetic and Molecular Characteristic of three Malaysian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *Tropical Life Science Res.* 24:65
9. Murashige, T and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and biassay with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 15:473
10. Ploetz, R.C. (2006) Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, *Phytopathology* 96:653
11. Robinson, J.C., (1996) *Banana and Plantains*, Book: Cab International Wallingford, UK. pp:238