

**VARIASI GENETIK DENGAN TEKNIK RAPD PADA MUTAN PISANG KEPOK YANG TAHAN TERHADAP PENYAKIT BDB HASIL MUTASI INDUKSI DENGAN EMS**

Mansyurdin<sup>1)</sup> dan Yulmira Yanti<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, Padang

<sup>2)</sup> Jurusan HPT Fakultas Pertanian, Padang

**ABSTRACT**

The mutant clone which resulted through induced mutation by EMS were selected 5 resistant clones of banana cultivar Kepok against BDB. Analysis of genetic variation was done by RAPD technique and genetic change of mutant by DNA sequencing. The band profile is resulted DNA amplification of mutant clones and non-mutant of Kepok's cultivar by using 4 primers (0PB01, 0PA02, 0PA09 dan OPH07) were resulted 160 bands, but polymorphic bands are low relative (3,75%). Based on polymorphic band profile that indicates EMS treatment to cultivar Kepok were caused relative low genetic variation. The genetic change of mutant clone were showed by *Query* 301 dan *Query* 358, that is disappear several base of DNA sequence, that indicates the mutation caused a deletion of nucleotides.

*Keywords: cultivar Kepok of banana; EMS; mutant; RAPD, BDB*

**I. PENDAHULUAN**

Produksi pisang di Indonesia cenderung menurun dari tahun ke tahun (Badan Pusat Statistik, 2006; Departemen Pertanian, 2006) yang terutama disebabkan oleh serangan penyakit layu darah (blood disease bacterium = BDB) (Fegan dan Prior, 2005). Pengendalian secara kimiawi (Satoko *et al.*, 2004) dan menggunakan agen hayati (Habazar, 2009) belum menunjukkan hasil yang optimal. Baharuddin (1994) melaporkan bahwa berdasarkan hasil inokulasi buatan ternyata tidak ada kultivar pisang ataupun jenis liar yang tahan terhadap patogen tersebut.

Mansyurdin *et al.* (2005) telah melakukan mutasi induksi pada pisang kepok, raja serai dan ambon dengan Ethyl Methane Sulphonate (EMS). Menurut Micke (1996), EMS menyebabkan perubahan pada DNA suatu tanaman sehingga struktur gen mengalami perubahan. Penelitian sejenis dilanjutkan oleh Mansyurdin *et al.* (2005) terhadap kultivar

pisang raja serai dan pisang kepok, hasilnya diperoleh 8 batang bibit mutan raja serai dan 5 batang mutan pisang kepok yang tahan terhadap penyakit BDB.

Perbanyak bibit tanaman dengan perlakuan mutagen secara *in vitro* memberikan hasil yang bervariasi pada tahap plantlet. Hasil penelitian Yanti *et al.* (2007) pada mutan pisang raja serai dan pisang kepok dengan perlakuan EMS memperlihatkan variasi morfologi. Selanjutnya Hautea *et al.* (2004) melaporkan bahwa mutan pisang kultivar Lakatan dan Latundan hasil perlakuan sinar gamma  $^{60}\text{Co}$  tidak memperlihatkan variasi secara morfologi tetapi bervariasi pada tingkat molekular dengan teknik RAPD.

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) mengetahui variasi genetik antara klon mutan dengan klon bukan mutan serta antar mutan sendiri; 2) mengetahui perubahan genetik yang terjadi pada mutan. Dengan diketahuinya variasi genetik mutan klon pisang Raja Sereh dan pisang Kepok yang tahan terhadap BDB maka akan membantu seleksi karakter agronomisnya di lapangan.

## II. METODE PENELITIAN

Analisis variasi genetik dan perubahan genetik dilakukan terhadap 5 individu mutan pisang kepok dan 5 individu pisang raja serai yang terseleksi tahan terhadap BDB serta pembandingnya pada bibit kedua kultivar pisang tanpa perlakuan mutasi.

### 2.1. Teknik RAPD

Potongan daun ditambahkan nitrogen cair, kemudian dihancurkan sampai halus. Tambahkan larutan buffer ekstrak (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM EDTA, 1,25% SDS (w/v), 0,38 gram Natrium disulfid setiap 100 ml buffer ekstraksi). Pada larutan tersebut ditambahkan Khisam dan disentrifugasi dengan *Centrifuge* 5810 (4000 rpm; 20 menit). Supernatan ditambah dengan alkohol 96% dengan perbandingan 1 : 2. Endapan DNA dilarutkan dalam 1xTE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA, pH 8), selanjutnya tambahkan RNase dan dipresipitasi kembali dengan etanol absolut dingin, terakhir tambahkan Na acetat (1/10 volume).

DNA diuji dengan metode elektroforesis pada gel agarose 0,8% dan penanda migrasi (*blue juice* (0,2% bromophenol blue (w/v) + 40% sukrosa (w/v))). Kuantitas DNA

diuji dengan spektrofotometer *Double-Beam-UV-150-02* (absorbansi 260 dan 280 nm). Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) = nilai  $\text{ABS}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times$  faktor pengenceran, 50  $\mu\text{g/ml}$  merupakan faktor konversi dari nilai absorbansi 260 = 1. Kemurnian DNA dihitung berdasarkan hasil bagi nilai  $\text{Absorbansi}_{260}$  dengan  $\text{Absorbansi}_{280}$ .

Penelitian ini menggunakan 10 primer, yaitu P1, P2, 0PB01, OPB05, 0PA02, 0PA12, 0PA09, OPJ09, OPD07, dan 0PH7. Amplifikasi DNA dilakukan mengikuti kondisi standar yang direkomendasikan oleh Williams *et al.* (1990). Volume akhir campuran reaksi adalah 25  $\mu\text{l}$  dengan komposisi reaksi 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,001% gelatin (w/v), 100  $\mu\text{M}$  masing-masing dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Promega), 5 pikomol primer, 25 ng DNA genom dan 1 unit Taq polimerase DNA. Proses amplifikasi berlangsung selama 45 siklus yang terdiri dari denaturasi, penempelan primer dan perpanjangan primer. Hasil amplifikasi diuji bersama DNA standar *1 kb DNA ladder* (Sigma, USA) dengan metode elektroforesis DNA pada gel 1,6% agarose. Kemudian gel direndam dalam 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ethidium Bromide dan divisualisasikan di bawah sinar UV dengan film instan Polaroid 667.

## 2.2. Sekuensing DNA

Program amplifikasi PCR digunakan dengan *hot-start* (95°C; 1 menit), denaturasi (94°C; 1 menit), optimasi *annealing* (36-60°C; 1 menit), ekstension (72°C; 2 menit) dan final ekstension (72°C; 5 menit). Siklus diulang sebanyak 30 kali. Konsentrasi Taq DNA polymerase dioptimasi dengan menambahkan 1-2 unit per reaksi yang dilarutkan dalam *nuclease free water* ke dalam reaksi PCR (mengandung *GoTaq® Green Master Mix*).

Sampel DNA hasil amplifikasi sebanyak 1  $\mu\text{l}$  dan dicampur dengan 1  $\mu\text{l}$  *loading dye* pada gel agarosa. *Running* dilakukan pada voltase 50 volt selama  $\pm 60$  menit sampai warna *loading dye*. Gel hasil elektroforesis selanjutnya direndam dalam larutan *ethidium bromide* selama 10-30 menit. Pita yang muncul pada gel elektroforesis diambil dan dipurifikasi. Sampel dimasukkan dalam *ABI 3130 Genetic Analyzer* bersama dengan Taq DNA polymerase dan DNTPs. Empat salinan reaksi amplifikasi PCR diperlakukan menggunakan primer tunggal, yang didesain untuk berikatan pada ujung 5' dari DNA cetakan yang

disekuen. Pada masing-masing empat campuran PCR, satu deoksinukleotida (dATP, dCTP, dGTP atau dTTP) diganti dengan analog dideoksinukleotida yang sesuai (ddATP, ddCTP, ddGTP atau ddTTP). Selama elektroforesis, posisi setiap puncak fluoressen diukur menggunakan kamera CCD pada akhir untai tunggal DNA yang bermigrasi melalui gel.

Penelusuran sekuens untuk mengetahui derajat kesamaan antara sekuens yang dihasilkan pada mangga sebagai *query* dengan sekuens yang telah dipublikasi dalam NCBI/GeneBank di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Penelusuran menggunakan program BLASTN yang berfungsi untuk membandingkan sekuens *query* nukleotida terhadap sekuens nukleotida pada *database*. Keluaran yang diperoleh berupa nilai harapan, skor kesamaan, identitas, *gap* dan matrik sekuens. Selanjutnya dilakukan analisis pada hasil yang diperoleh.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

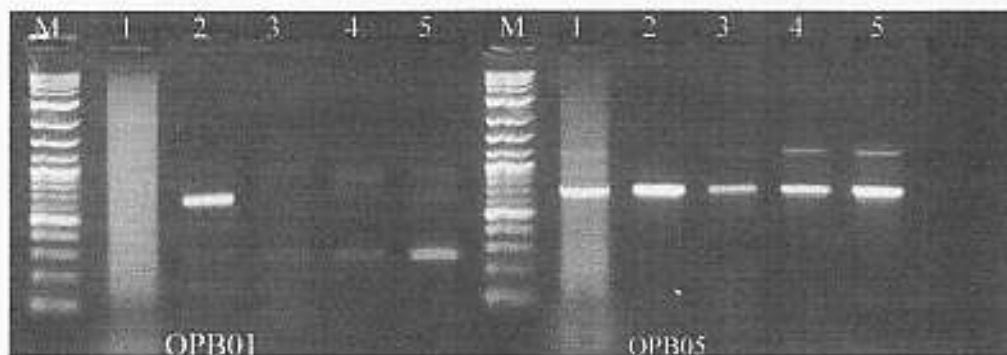
#### 3.1. Variasi Genetik Mutan

Hasil amplifikasi terhadap campuran DNA dari 4 klon mutan dan 1 klon bukan mutan pisang Kepok dengan primer OPB01 dan OPB05 dihasilkan 11 total pita dan 7 total pita secara berturut-turut (Gambar 1). Hanya satu pita pada mutan yang tampak polimorfik dengan primer OPB01. Selanjutnya dengan menggunakan primer OPB05 pada klon mutan perlakuan 0,5% EMS - 2 jam dan klon mutan perlakuan 0,5% EMS - 5 jam terbentuk masing-masing 2 pita yang monomorfik. Dengan primer OPA09 dan OPJ09 dihasilkan 28 total pita dan 35 total pita secara berturut-turut (Gambar 2). Dengan menggunakan primer OPA09 tampak hanya 2 pita yang polimorfik. Dengan menggunakan primer OPD07 dan OPH07 dihasilkan berturut-turut 25 pita dan 33 pita (Gambar 3). Pada klon mutan perlakuan 0,5% EMS - 5 jam dihasilkan 8 pita. Dengan menggunakan primer tersebut hanya 1 pita yang tergolong polimorfik.

Bersarkan profil pita hasil amplifikasi DNA dari 4 klon mutan dan 1 klon bukan mutan pisang Kepok mampu memperlihatkan pita dengan menggunakan 8 primer (P1, OPB01, OPB05, OPA02, OPA09, OPJ09, OPD07 dan OPH07). Sedangkan pada pisang Raja Sereh hanya 4 primer (OPA04, OPD11, OPH07 dan OPA19) yang memperlihatkan

pita. Bibi *et al.* (2009) melaporkan bahwa antara mutan padi cultivars IR6 and IR8 yang diiradiasi dengan sinar gamma tidak memiliki kesamaan polimorfisme fragmen DNA.

Hasil amplifikasi terhadap campuran DNA dari 4 klon mutan dan 1 klon bukan mutan pisang Raja Sereh dengan menggunakan 8 primer dihasilkan 160 total pita (Tabel 1). Meskipun jumlah total banyak terbentuk tetapi pita yang polimorfik hanya dihasilkan jika menggunakan primer OPB01, OPA02, OPA09 dan OPH07 dengan jumlah total yang relatif rendah yaitu 6 pita (3,75%). Berdasarkan persentase jumlah pita yang polimorfik dari keempat primer tersebut maka dapat dinyatakan bahwa perubahan genetik atau mutasi relatif rendah pada mutan pisang Raja Sereh akibat perlakuan EMS.



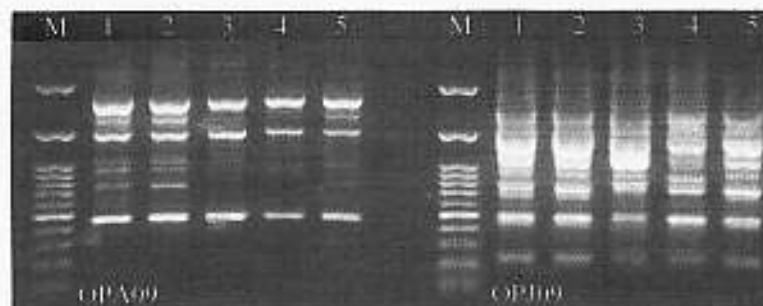
Gambar 1. Hasil amplifikasi terhadap campuran DNA pisang Kepok dengan menggunakan primer OPB01 dan OPB05. M = 1 Kb DNA Ladder; 1= klon bukan mutan (kontrol) ; 2 = klon mutan perlakuan 0,2% EMS - 2 jam; 3 = klon mutan perlakuan 0,2% EMS - 5 jam; 4 = klon mutan perlakuan A2 0,5% EMS - 2 jam; dan 5 = klon mutan perlakuan 0,5% EMS - 5 jam



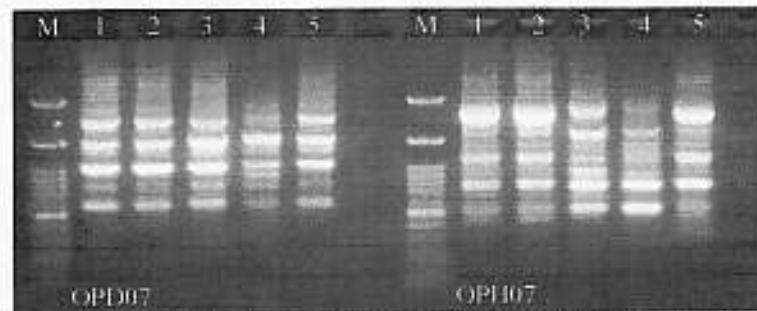
### 3.2. Perubahan Genetik pada Mutan

Perubahan genetik pada klon mutan pisang kepok hasil perlakuan 0,5% EMS – 2 jam dengan penelusuran sekuens SCAR18 yang menggunakan 13 *query* dapat dilihat dari matriks pada gambar 4. Pada *Query* 301 diketahui bahwa tidak muncul 3 basa yang merupakan pasangan dari basa CCG pada subject (sampel DNA mutan). Selanjutnya pada *Query* 358 juga tidak muncul 7 basa yang merupakan pasangan dari AGAGTAG pada subject (sampel DNA mutan). Berdasarkan tidak muncul basa pada *Query* 301 dan *Query* 358 dapat dinyatakan bahwa pada DNA mutan terjadi mutasi.

Perubahan genetik pada mutan pisang yaitu berupa tidak muncul beberapa basa pada sekuen DNA membuktikan bahwa mutasi tidak terjadi pada tingkat lokus melainkan perubahan yaitu pada nukleotida. Menurut Kanra and Brunner (1970) EMS merupakan agen pengalkilasi yang menyebabkan perubahan sekuen nukleotida. Selanjutnya Selvi *et al.* (2007) menyatakan bahwa penampakan dan hilangnya pita pada fragmen DNA dari mutant *Embluca Officinalis* Gaertn.) hasil iradiasi sinar gamma merupakan hasil perubahan struktur DNA (patahan, transposisi atau delesi).



Gambar 2. Hasil amplifikasi terhadap campuran DNA dari 4 klon mutan dan 1 klon bukan mutan pisang Kepok dengan menggunakan primer OPA09 dan OPJ09. M = 1 Kb DNA Ladder; 1= klon bukan mutan (kontrol) ; 2 = klon mutan perlakuan 0,2% EMS - 2 jam; 3 = klon mutan perlakuan 0,2% EMS - 5 jam; 4 = klon mutan perlakuan 0,5% EMS - 2 jam; dan 5 = klon mutan perlakuan 0,5% EMS - 5 jam



Gambar 3. Hasil amplifikasi terhadap campuran DNA pisang Kepok dengan menggunakan primer OPD07 dan OPH07. M = 1 Kb DNA Ladder; 1= klon bukan mutan (kontrol) ; 2 = klon mutan perlakuan 0,2% EMS - 2 jam; 3 = klon mutan perlakuan 0,2% EMS - 5 jam; 4 = klon mutan perlakuan 0,5% EMS - 2 jam; dan 5 = klon mutan perlakuan 0,5% EMS - 5 jam

Tabel 1. Primer, susunan basa dan jumlah pita hasil amplifikasi terhadap campuran DNA dari 4 klon mutan dan 1 klon bukan mutan pisang Kepok

Primer	Sekuen (5'-3')	Jumlah Pita		Total
		Monomorfik	Polimorfik	
P1	GGTGCGGGAA	4	0	4
P2	GTGGCGGGAG	-	-	-
0PB01	GTTTCGCTCC	10	1	11
0PB05	TGCGCCCTTC)	7	0	7
0PA02	TGCCGAGCTG	25	2	27
0PA12	TCGGCGATAG	-	-	-
0PA09	GGGTAACGCC	24	2	28
0PJ09	TGAGCCTCAC	35	0	35
OPD07	TTGGCACGGG	25	0	25
OPH07	CTGCATCGTG	24	1	27
Total		154	6	160
Persentase		96,25%	3,75%	

```

Query 1 AAGCTTAAATCTTTGTGTTATCTTGTGTGAGGCATAGGGTAGCCATGGATAACATAAATA 60
      |||
Sbjct 1 AAGCTTAAATCTTTGTGTTATCTTGTGTGAGGCATAGGGTAGCCATGGATAACATAAATA 60

Query 61 ACCAAATATTCTGAGTTTTTAAAGGTTTGTGGATTAGAAAATAGTTTTTCAAATAGTGA 120
      |||
Sbjct 61 ACCAAATATTCTGAGTTTTTAAAGGTTTGTGGATTAGAAAATAGTTTTTCAAATAGTGA 120

Query 121 TTGATATTGGAGAACTGAAGTGACCATAACGATTAATAAGGTAGACCACAGTTTGAAGAC 180
      |||
Sbjct 121 TTGATATTGGAGAACTGAAGTGACCATAACGATTAATAAGGTAGACCACAGTTTGAAGAC 180

Query 181 TGTAGACCAAAAGATTGTGGGCATGGAGGCTTGTGTAGAAGTGTGAGACCAATTTCTAC 240
      |||
Sbjct 181 TGTAGACCAAAAGATTGTGGGCATGGAGGCTTGTGTAGAAGTGTGAGACCAATTTCTAC 240

Query 241 GATATGTCGATATTTGCGTTTCAGTAGGCCAACTAGTTAAAGAGTCTGTGGAGGTGACTT 300
      |||
Sbjct 241 GATATGTCGATATTTGCGTTTCAGTAGGCCAACTAGTTAAAGAGTCTGTGGAGGTGACTT 300

Query 301 AAGGTGTTGGATGCCATAGSTTGAGAGATAGGATATGAGGGCTTGATATTTACC---CC 357
      |||
Sbjct 301 AAGGTGTTGGATGCCATAGSTTGAGAGATAGGATATGAGGGCTTGATATTTACC---CC 360

Query 358 ATC-----ACTATTTAATTATAGACTGAAAGAAGTTTTTGACCAGTTTTTAAAGTT 410
      |||
Sbjct 361 ATCAGAGTAGACTATTTAATTATAGACTGAAAGAAGTTTTTGACCAGTTTTTAAAGTT 420

Query 411 GGTGAAGATTGTTAAATTTTTGAGTTATGACGAAGAGGGTATATCCATGTGTACTTAGT 470
      |||
Sbjct 421 GGTGAAGATTGTTAAATTTTTGAGTTATGACGAAGAGGGTATATCCATGTGTACTTAGT 480

Query 471 AAAATAGTCTACAAAATAACATAAAAATCTAAATTTATCRAAAGAAGTGACGAGAGCAA 530
      |||
Sbjct 481 AAAATAGTCTACAAAATAACATAAAAATCTAAATTTATCRAAAGAAGTGACGAGAGCAA 540

Query 531 GCCCCAAACATCAGTATAAATAATTTCAAATAGTTTAGAACATGATATGGAAGAAGTGCC 590
      |||
Sbjct 541 GCCCCAAACATCAGTATAAATAATTTCAAATAGTTTAGAACATGATATGGAAGAAGTGCC 600

Query 591 AAAAGGGAGTCTATGACTTTTATTACTGAGACAAGCATCGCTATTATTTGTAAGAGTAGG 650
      |||
Sbjct 601 AAAAGGGAGTCTATGACTTTTATTACTGAGACAAGCATCGCTATTATTTGTAAGAGTAGG 660

Query 651 AAGAGATAACGAAAAGTAATTTATTTTGGTTAAAGAGTGAGGGATGACTGAGACGATGA 710
      |||
Sbjct 661 AAGAGATAACGAAAAGTAATTTATTTTGGTTAAAGAGTGAGGGATGACTGAGACGATGA 720

Query 711 TGCCACACAT 720
      |||
Sbjct 721 TGCCACACAT 730

```

Gambar 4. Matriks penelusuran sekuens SCAR18 pada klon mutan pisang kepok hasil perlakuan 0,5% EMS – 2 jam. Score = 1284 bits (695); Expect = 0.0; Identities = 720/730 (98%), Gaps = 10/730 (1%); Strand=Plus/Plus



#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis genetik mutan pisang Kepok serta bukan mutannya (kontrol) dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Klon pisang Kepok mutan dan bukan mutan memiliki variasi genetik dengan jumlah pita polimorfik sebanyak 6 pita (3,75%) dari 160 pita yang muncul dengan 10 primer.
2. Perubahan genetik pada mutan pisang yaitu berupa tidak muncul beberapa basa pada sekuen DNA membuktikan bahwa mutasi tidak terjadi pada tingkat lokus melainkan perubahan yaitu pada nukleotida.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik. 2006. *Statistik Indonesia*. Badan Pusat Statistik. Jakarta. Indonesia.
- Baharuddin. 1994. Pathological, biochemical and serological characterization of the blood diseases bacterium affecting banana and plantain (*Musa* spp.) in Indonesia. *Disertation*. Georg August Univ. Gottingen, Germany.
- de Carvalho Freire L.L.; A.B.L da Costa; L.B. Góes; N.T. de Oliveira. 2001. DNA Polymorphism and total protein in mutants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin straine. *Brazilian J. Microbiol.* 32:93-97.
- Depatemen Pertanian. 2006. Pengendalian Penyakit Darah Pada Pisang. Badang Karantina Pertanian. Jakarta, Indonesia.
- Espino, R.R.C. and Pimentel, R. B. 1988. Electrophoretic analysis of selected isozymes in BB cultivars of Philippine bananas, in: *Identification of Genetic Diversity in the Genus Musa*, R.L. Jarret (editor). Proceedings of an International Workshop Held at Los Banos, Philippine 5-10 September 1988. 36-40.
- Fegan dan Prior. 2005. Bacterial Wilt Disease and the “*Ralstonia solanacearum* species complex” (Ed. by C. Allen, Prior, A.C. Hayward) st. Paul. APS Press. USA. 25-27.
- Habazar, T. 2000. Teknik pengendalian penyakit *Fusarium oxysporum* fsp. *Cubense* dan bakteri *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum* pada tanaman pisang dan upaya pengembangan pisang di daerah sentra produksi utama. Makalah dalam Pertemuan koordinasi kegiatan Pengembangan Produksi Pisang Unggulan, tgl 30 Oktober di DIPERTA Prop. Sumbar. Padang.

- Hautea, D.M., G.C. Molina, C.H. Palantero, N.B. Coronado, E.B. Perez, M.T.H. Alvarez, A.O. Canama, R.H. Akuba, R.B. Quilloy, R.B. Frankie, C.S. Caspillo. 2004. Analysis of Induced Mutants Philippine Bananas with Random Marker. In *Banana Improvement Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations*. Editors Jain. S.M and Swennen. R. Science Publishers, INC, USA, 45-57.
- Kanra, O.P. and Brunner, H. 1970. Chemical mutagens. Mode of action. In: *Manual in Mutation Breeding*. FAO/IAEA. Tech. Rept. Ser.119 (pp 62-64).
- Kumar, S., K. V. Prasad and M. L. Choudhary. 2006. Detection of genetic variability among chrysanthemum radiomutants using RAPD markers. *Current Sci.* 90(8): 1108-1113.
- Kumari V., M.V.C. Gowda and R. Bhat. 2009. Molecular characterization of induced mutants in groundnut using random amplified polymorphic DNA markers. *Karnataka J. Agric. Sci.*, 22(2) : 276-279.
- Mansyurdin, Netty, W.S., Burhan, W., Hamru, Habazar, T., Dahlan, S., Rahmi, A., Almusfira, Krif, Y., dan Siregar, S.. 2005. Induksi mutasi pada pisang ambon hijau dengan EMS dan uji ketahanan mutannya terhadap penyakit Moko. Makalah Seminar Nasional MIPA BKS Wilayah Barat, 17 - 19 Juli 2005 di Universitas Jambi.
- Micke, A. 1996. 70 years induced mutations – to be reconsidered ?. *Mutation Breeding Newsletter*. No. 42, 22-24.
- Selvi, B.S.; V. Ponnuswami and T. Sumathi. 2007. Identification of DNA polymorphism induced by gamma ray irradiation in Amla (*Emblica Officinalis* Gaertn.) grafts of V1 M1 and V2 M1 generation. *J. Appl. Sci. Research*, 3(12): 1933-1935.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wongsawad P., C. Wongsawad, S. Mahadthanapuk, S. Kantawong, P. Chariyavidhawat and T. Paratasilpin. 2005. Mutation in rice using Ethyl Methanesulphonate. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005. Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50202, Thailand.
- Yanti, Y., Habazar, T., Mansyurdin, Mardinus. 2007. Variasi morfologi planlet pisang Raja Sereh dengan perlakuan mutagen Ethyl Methanesulphonate secara *in vitro*. *Akta Agrosia*. IX: 25-30.