

# Penggunaan Aksis Jantung Pisang untuk Penyediaan Sumber Eksplan Bebas Bakteri

## (The Use of Floral Axis of Banana for Supplying Bacterial-free Explant Sources)

Ika Roostika<sup>1\*</sup>, Yati Supriati<sup>1</sup>, dan Agus Sutanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia  
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: ikatambunan@yahoo.com

<sup>2</sup>Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Jl. Raya Solok-Aripan Km.8, Solok 27351 Indonesia

Diajukan: 4 Agustus 2015; Direvisi: 16 September 2015; Diterima: 12 November 2015

### ABSTRACT

The sterile culture is very important in cryopreservation works. Bacterial-free explant sources are difficult to obtain during *in vitro* culture of banana. Floral bud is expected as bacterial-free explant sources because the organ emerges above the ground and protected by bracts. The purposes of this study are to obtain optimal concentration of BA to regenerate male bud floral axis explants of Barangan variety and to prove that cultures derived from these explants were free from bacterial contamination. Two-millimeter pieces of male bud floral axis of Barangan variety were planted on MS medium containing of 1  $\mu\text{M}$  IAA, 200 g/l CH, and 2% sucrose. Experiment was arranged in Completely Randomized Design with the treatment of BA (5, 10, 15, 20, and 25  $\mu\text{M}$ ) in 10 replications. Subculture was conducted by using MS media containing of 10  $\mu\text{M}$  BA and 1  $\mu\text{M}$  IAA. The variable observed were percentage of browning, number of nodules, number of shoots, number of normal shoots, number of abnormal shoots, and number of nonsurvived shoots. The screening towards bacterial contamination was conducted by using medium containing of 10 g/l trypton, 10 g/l glucose, and 5 g/l yeast extract. The results showed that the explants could regenerate into shoots. The 25  $\mu\text{M}$  BA was the best treatment because it could produce the highest number of total and normal shoots, i.e. 9.2 shoots/explant and 6 shoots/explant, respectively. All of the shoots regenerated from male bud floral axis were 100% free from bacterial contamination, whereas all of the shoots regenerated from suckers were contaminated by bacteria.

**Keywords:** Banana, *in vitro* regeneration, benzyladenine, bacterial contaminant, screening.

### ABSTRAK

Penyediaan biakan yang steril menjadi syarat utama dalam keberhasilan kriopreservasi. Sumber eksplan yang bebas kontaminasi bakteri sulit diperoleh pada kultur *in vitro* pisang. Jantung pisang merupakan organ yang tumbuh jauh di atas permukaan tanah dan aksisnya terlindung oleh braktea sehingga diduga akan terbebas dari bakteri kontaminan. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh taraf *benzyladenine* (BA) yang efektif untuk meregenerasikan aksis jantung pisang Barangan dan membuktikan bahwa biakan yang diregenerasikan dari eksplan tersebut terbebas dari kontaminasi bakteri. Eksplan berupa potongan melintang aksis jantung pisang Barangan dengan ketebalan sekitar 2 mm ditanam pada media MS yang mengandung *indole acetic acid* (IAA) 1  $\mu\text{M}$ , *casein hydrolyisate* (CH) 200 g/l, dan sukrosa 2%. Percobaan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan BA (5, 10, 15, 20, dan 25  $\mu\text{M}$ ) dan 10 ulangan. Subkultur dilakukan dengan menggunakan media MS yang mengandung BA 10  $\mu\text{M}$  dan IAA 1  $\mu\text{M}$ . Peubah yang diamati adalah pencokelatan, jumlah nodul, jumlah total tunas, jumlah tunas yang normal, jumlah tunas yang abnormal, dan jumlah tunas yang mati. Skrining biakan terhadap kontaminasi bakteri dilakukan menggunakan media yang mengandung *trypton* 10 g/l, glukosa 10 g/l, dan ekstrak khamir 5 g/l. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan aksis jantung dapat beregenerasi menjadi tunas. BA 25  $\mu\text{M}$  merupakan perlakuan yang terbaik karena menghasilkan jumlah total tunas dan tunas normal terbanyak, yaitu 9,2 tunas/eksplan dan 6 tunas/eksplan masing-masing. Seluruh tunas *in vitro* (100%) yang diregenerasikan dari aksis jantung terbebas dari kontaminasi bakteri, sedangkan seluruh tunas yang diregenerasikan dari anakan terbukti terkontaminasi bakteri.

**Kata kunci:** Pisang, regenerasi *in vitro*, *benzyladenine*, kontaminasi bakteri, skrining.

## PENDAHULUAN

Penyediaan biakan yang steril menjadi syarat utama dalam seluruh kegiatan kultur *in vitro* tanaman, terutama pada kegiatan kriopreservasi karena eksplan akan terpapar sukrosa dengan konsentrasi tinggi (hingga 0,4 M) sebelum dan setelah disimpan dalam nitrogen cair (Sakai, 1993). Taraf sukrosa yang tinggi tersebut akan menyebabkan tingginya risiko kontaminasi oleh bakteri apabila eksplan yang digunakan belum terbebas dari bakteri.

Kontaminasi bakteri merupakan masalah utama dalam perbanyakan *in vitro* tanaman pisang (Iqbal *et al.*, 2013). Bakteri tersebut merupakan bakteri endofitik atau bakteri yang terdapat di dalam jaringan tanaman. Biakan pisang cukup sulit dibebaskan dari bakteri tersebut karena memiliki endospora yang tahan terhadap etanol konsentrasi tinggi (hingga 96%). Secara visual, massa bakteri baru dapat diamati telah mengontaminasi biakan setelah eksplan disubkultur. Pusat penelitian yang berskala internasional bahkan seringkali tidak menyadari terjadinya kontaminasi bakteri pada biakan pisang sebelum dilakukan pertukaran plasma nutfah (Panis, komunikasi pribadi, 2013). Oleh karena itu, perlu dicari metode induksi dan proliferasi tunas *in vitro* pisang yang dapat membebaskan biakan dari kontaminasi bakteri.

Induksi tunas *in vitro* yang berasal dari anakan (*sucker*) paling umum diterapkan pada mikropropagasi pisang, seperti yang dilakukan oleh Bhosale *et al.* (2011). Namun demikian, cara tersebut berisiko tinggi terhadap terjadinya kontaminasi, baik oleh jamur maupun bakteri yang berasal dari tanah. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan bahan tanaman lain, yaitu bagian tengah/aksis jantung. Jantung pisang merupakan organ yang tumbuh jauh di atas permukaan tanah dan aksisnya terlindung oleh braktea sehingga diduga akan terbebas dari bakteri.

Krikorian *et al.* (1999) bahkan melaporkan bahwa infeksi virus *Banana streak virus* (BSV) lebih banyak dijumpai pada tanaman pisang yang berasal dari anakan (32%) dibanding dengan yang berasal dari aksis jantung (5%) dan benih yang dihasilkan dari aksis jantung memiliki keseragaman fenotipe yang tinggi dibanding dengan yang berasal dari anakan. Hal ini mengindikasikan bahwa aksis jantung berpeluang besar diaplikasikan pada perbanyakan *in vitro* pisang untuk berbagai keperluan, seperti produksi benih secara massal dan untuk penyediaan sumber eksplan yang bebas kontaminasi dalam kegiatan kriopreservasi khususnya.

Induksi tunas *in vitro* dari jantung pisang telah dilaporkan di mancanegara, yaitu menggunakan eksplan berupa aksis, sisir (*hands*) berukuran sekitar 0,5 cm, dan seperempat bagian jantung yang dipotong secara vertikal dengan panjang 0,5–2 cm (Darvari *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2002; Krikorian *et al.*, 1993, 1999; Mahadev *et al.*, 2011; Resmi dan Nair, 2007). Pada kultur *in vitro* pisang, sitokinin berupa *benzyladenine* (BA) paling sering digunakan untuk multiplikasi tunas. Konsentrasi BA yang digunakan berbeda-beda, bergantung pada varietas dan jaringan eksplan yang digunakan (Buah *et al.*, 2010; Darvari *et al.*, 2010; Jafari *et al.*, 2011; Youmbi *et al.*, 2006). Sementara itu, pembuktian bahwa biakan yang diregenerasikan dari aksis jantung bebas dari kontaminasi bakteri belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh taraf BA yang efektif untuk meregenerasi aksis jantung pisang Barangan dan membuktikan bahwa biakan yang diregenerasikan dari eksplan tersebut terbebas dari kontaminasi bakteri.

## BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini berasal dari pisang Barangan (bergenom AAA) yang ditanam di Kebun Percobaan Cikeumeuh milik Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. Jantung pisang dipanen dari tanaman induk yang sudah berbuah. Penelitian terbagi atas dua tahap, yaitu induksi tunas *in vitro* dari aksis jantung dan skrining biakan terhadap kontaminasi bakteri.

### Induksi Tunas *In Vitro* dari Aksis Jantung

Jantung pisang dipotong dan dikupas brakteanya hingga panjangnya berukuran sekitar 15 cm lalu dicuci dengan detergen dan direndam dalam fungisida dan bakterisida selama 3 jam. Sterilisasi berturut-turut dilakukan dengan menggunakan alkohol 70%, NaOCl 1,58% dan 1,05% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, jantung pisang dicuci dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Helaian braktea dibuang satu per satu hingga tersisa aksis atau tangkai jantung. Aksis jantung kemudian diiris tipis-tipis secara melintang dengan ukuran sekitar 2 mm. Selanjutnya, irisan-irisan tipis tersebut dibelah menjadi dua bagian atau menjadi setengah keping. Kepingan tersebut digunakan sebagai eksplan.

Eksplan ditanam pada media MS yang mengandung *indole acetic acid* (IAA) 1  $\mu$ M, *casein hydrolysate* (CH) 200 g/l, dan sukrosa 2%. Percobaan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan

BA pada taraf 5, 10, 15, 20, dan 25  $\mu\text{M}$ . Setiap perlakuan diulang sebanyak 10 kali (botol) dan setiap botol berisi dua eksplan. Derajat kemasaman media ditera pada pH 5,7–5,8 sebelum diotoklaf. Eksplan diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu 25°C, pencahayaan 1.000 lux, dan fotoperiodisitas 16 jam. Pada awal pertumbuhan atau 2,5 bulan setelah tanam (BST), peubah yang diamati adalah jumlah eksplan yang berkalus, jumlah eksplan yang mengalami pencokelatan, jumlah nodul, dan jumlah tunas yang terbentuk. Setelah itu, biakan disubkultur untuk meregenerasikan nodul dan memanjangkan tunas yang telah terbentuk sebelumnya. Media subkultur yang digunakan adalah media MS yang ditambah dengan BA 10  $\mu\text{M}$  dan IAA 1  $\mu\text{M}$  (Panis, 2009) yang merupakan media baku untuk multiplikasi tunas *in vitro* pisang di bank gen milik *International Transit Center* (ITC), Belgia. Dua setengah bulan setelah subkultur (BSS) dilakukan pengamatan jumlah total tunas, jumlah tunas normal, jumlah tunas abnormal, dan jumlah tunas mati.

Tunas-tunas yang terbentuk dipelihara menggunakan media yang sama (media MS ditambah dengan BA 10  $\mu\text{M}$  dan IAA 1  $\mu\text{M}$ ) hingga membentuk planlet. Planlet yang terbentuk diaklimatisasi. Sebagai kontrol, digunakan planlet yang diregenerasikan dari anakan. Pertama kali, anakan dibersihkan dari kotoran atau tanah dan dicuci dengan detergen. Selanjutnya, anakan disterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 10 menit, dilanjutkan dengan NaOCl 1,58% selama 10 menit dan NaOCl 1,05% selama 20 menit. Eksplan berupa tunas pucuk (dari anakan) diisolasi, ditanam, dan disubkultur pada media yang sama. Perlakuan subkultur dilakukan hingga tunas mengalami multiplikasi dan induksi akar atau membentuk planlet. Sebanyak 15 planlet masing-masing yang berasal dari aksis jantung dan anakan diaklimatisasi. Planlet dikeluarkan dari botolnya dan dicuci bersih dengan air untuk menghilangkan bekas media yang tersisa. Planlet diaklimatisasi di dalam *polybag* yang berisi tanah dan pupuk kandang dengan rasio 1 : 1. Planlet disungkup secara total dengan gelas akua selama 2 minggu. Pada minggu ke-3, sebagian sungkup gelas akua dibuka pada sore hari dan pada minggu berikutnya sungkup dibuka secara total. Respons yang diamati adalah persentase keberhasilan aklimatisasi (persentase bibit hidup).

#### **Skrining Biakan terhadap Kontaminasi Bakteri**

Untuk menguji adanya kontaminasi bakteri maka dilakukan skrining. Sebanyak tiga tunas *in vitro* masing-masing yang diregenerasikan dari eksplan aksis jantung dan anakan dipotong pangkal-

nya. Bagian tersebut diusapkan secara zig-zag sepanjang diameter botol pada media skrining bakteri yang mengandung *trypton* 10 g/l, glukosa 10 g/l, dan ekstrak khamir 5 g/l (Panis, 2009). Potongan basal/pangkal tunas diletakkan pada ujung usapan zig-zag, yaitu di bagian dekat pinggir botol. Sebagai kontrol, digunakan tunas-tunas yang diregenerasikan dari anakan. Tunas (dari anakan) yang dipilih sebagai kontrol pengujian kontaminasi adalah tunas yang secara visual tidak terdeteksi terkontaminasi bakteri. Kontaminasi bakteri dicirikan dengan adanya massa sel berwarna putih atau kuning di sekitar pangkal tunas. Sebaliknya, biakan yang diduga tidak terkontaminasi bakteri tidak memperlihatkan massa sel tersebut sehingga media tetap berwarna bening atau transparan. Inkubasi dilakukan di ruang kultur dengan suhu 25°C pada kondisi gelap selama seminggu. Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap munculnya bakteri di atas permukaan media. Potongan pangkal tunas yang memunculkan massa bakteri, yaitu lendir yang berwarna kekuningan pada area bekas olesan, menandakan bahwa biakan asalnya tidak bebas dari bakteri, walaupun pada awalnya tidak terdeteksi secara visual.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase pencokelatan dan pembentukan kalus pada 2,5 BST dipengaruhi oleh taraf BA pada media induksi (Tabel 1), sedangkan jumlah nodul dan jumlah tunas pada 2,5 BST tidak dipengaruhi oleh taraf BA (Tabel 2). Demikian pula setelah dilakukan subkultur, jumlah tunas normal pada 2,5 BSS dipengaruhi oleh taraf BA. Sebaliknya, jumlah total tunas yang beregenerasi, jumlah tunas abnormal, dan jumlah tunas yang mati tidak dipengaruhi oleh taraf BA (Tabel 3).

#### **Induksi Tunas *In Vitro* dari Aksis Jantung**

Pada penelitian ini, digunakan kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang lebih sederhana untuk menginduksi tunas *in vitro* dari eksplan potongan transversal/melintang aksis jantung, yaitu BA dan IAA. Mahadev *et al.* (2011) menggunakan ZPT yang lebih bervariasi, yaitu BA, *naphthalene acetic acid* (NAA), asam giberelin ( $\text{GA}_3$ ), ditambah dengan air kelapa (mengandung difenil urea) untuk menginduksi tunas *in vitro* dari eksplan irisan jantung.

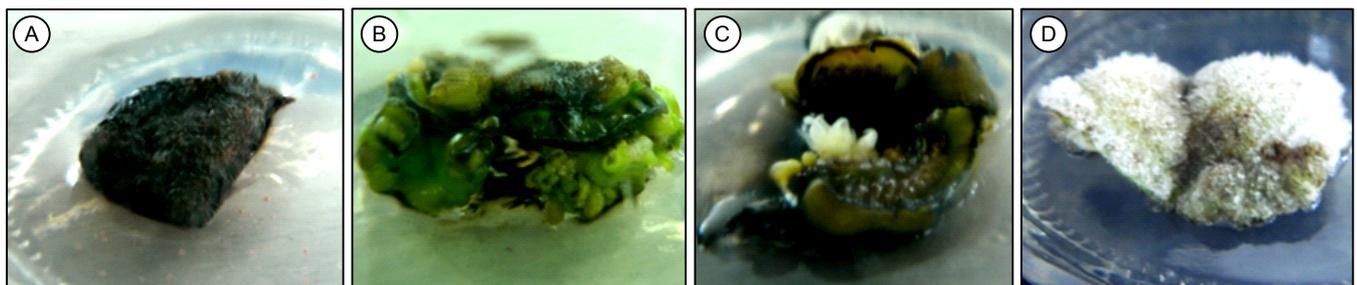
Respons potongan melintang aksis jantung terhadap taraf BA didahului dengan penggembungan. Eksplan yang mengalami pencokelatan pada seluruh permukaannya tidak mengalami penggembungan (Gambar 1A). Sebagian eksplan yang menggembung

membentuk nodul (Gambar 1B) dan sebagian lainnya membentuk kalus (Gambar 1C). Nodul terinisiasi dari sisi yang berdekatan dengan bekas menempelnya braktea. Hal ini berarti, sisi yang berdekatan dengan braktea merupakan bagian yang bersifat meristematis. Nodul yang terbentuk pada penelitian ini ada yang berwarna putih dengan morfologi yang menyerupai kuncup bunga (Gambar 1D). Organ tersebut oleh Darvari *et al.* (2010) disebut sebagai *cauliflower like bodies* (CLB). Organ tersebut kemudian menghijau dan sebagian berubah menjadi tunas. Hal ini menunjukkan bahwa ZPT, sitokinin khususnya, memberikan pengaruh terhadap pembentukan tunas dari eksplan potongan melintang aksis jantung. Sitokinin dilaporkan mampu mereduksi dominansi apikal dari meristem dan dapat menginduksi pembentukan tunas aksilar atau tunas adventif dari jaringan yang bersifat meristematis (Madhulatha *et al.*, 2004).

Selain pembentukan nodul, pembentukan kalus juga teramati dengan struktur yang kompak menyerupai kapas. Kalus tersebut tidak bersifat embriogenik atau organogenik dan terbentuk di atas permukaan eksplan atau bagian yang terluka saat pemotongan aksis jantung. Hasil percobaan menunjukkan bahwa taraf BA memengaruhi pembentukan kalus. Taraf BA 5  $\mu\text{M}$  belum mampu menginduksi pembentukan kalus dan mengindikasikan tidak terjadinya pembelahan sel. Taraf BA 10  $\mu\text{M}$  mampu menginduksi pembentukan kalus (45,5%) dan persentase pembentukan kalus yang tertinggi diperoleh pada per-

lakukan BA 15  $\mu\text{M}$  (Tabel 1). Fenomena tersebut menimbulkan dugaan bahwa pada taraf BA 15  $\mu\text{M}$ , rasio sitokinin dan auksin endogen berada dalam keadaan seimbang sehingga memunculkan respons pembentukan kalus (Taiz dan Zeiger, 2002), yaitu sebesar 70%. Peningkatan taraf BA eksogen lebih lanjut diduga menyebabkan peningkatan rasio sitokinin dan auksin endogen sehingga pada taraf BA 20  $\mu\text{M}$  dan 25  $\mu\text{M}$ , persentase terbentuknya kalus menurun, berturut-turut 54,5% dan 20%.

Tingkat pencokelatan pada eksplan cukup tinggi dan berkisar antara 40–70%. Tingkat pencokelatan yang tertinggi diperoleh pada perlakuan BA 15  $\mu\text{M}$  (Tabel 1). Walaupun tingkat pencokelatan cukup tinggi, eksplan masih dapat beregenerasi karena intensitas pencokelatan yang terjadi pada eksplan aksis jantung lebih rendah daripada yang biasa terjadi pada anakan. Pencokelatan yang biasa terjadi pada anakan tidak hanya menyebabkan eksplan menjadi cokelat, namun media juga menjadi cokelat tua, bahkan hitam. Pencokelatan umum terjadi pada kultur *in vitro* pisang, bahkan dapat bersifat mematikan sebagaimana dilaporkan oleh Ko *et al.* (2009), pada siklus ketiga selama proses mikropropagasi tanaman pisang Cavendish. Pencokelatan diduga disebabkan oleh tingginya aktivitas polifenol oksidase. Aktivitas yang tinggi dari enzim tersebut dapat merombak senyawa fenol menjadi kuinon (yang berwarna cokelat gelap) yang bersifat toksik terhadap jaringan tanaman sehingga dapat menghambat proses regenerasi



**Gambar 1.** Pertumbuhan awal (2,5 BST) potongan melintang aksis jantung pisang Barangan. A = mencokelat, B = membentuk nodul tunas, C = membentuk *cauliflower like bodies*, D = membentuk kalus.

**Tabel 1.** Pengaruh taraf BA terhadap pencokelatan dan pembentukan kalus dari potongan melintang aksis jantung pisang Barangan pada 2,5 BST.

Taraf BA ( $\mu\text{M}$ )	Pencokelatan (%)	Pembentukan kalus (%)
5	67,5 bc	0,0 a
10	41,8 a	45,5 bc
15	74,0 c	70,0 c
20	45,5 ab	54,5 bc
25	49,0 ab	20,0 ab

Huruf yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar perlakuan berdasarkan uji lanjut DMRT 5%.

eksplan. Kejadian pencokelatan juga dilaporkan pada biakan pisang Barangan oleh Nisyawati dan Kariyana (2013).

Pada umur 2,5 BST, perlakuan BA 25  $\mu\text{M}$  menghasilkan nodul dengan jumlah terbanyak, namun tunas terinduksi lebih awal pada perlakuan BA 20  $\mu\text{M}$  (Tabel 2). Setelah melalui satu kali subkultur ke media MS yang mengandung BA 10  $\mu\text{M}$  dan IAA 1  $\mu\text{M}$ , nodul dari semua perlakuan BA mampu tumbuh menjadi tunas dan tunas mampu tumbuh menjadi planlet (berakar).

Dibanding dengan penelitian Darvari *et al.* (2010), hasil penelitian ini memerlukan tahapan dan waktu yang lebih singkat (5 bulan) dengan satu kali subkultur dan lebih sederhana karena multiplikasi tunas dan induksi perakaran dapat terjadi secara bersamaan dengan menggunakan media yang sama.

Darvari *et al.* (2010) melakukan subkultur sebanyak dua kali untuk meregenerasikan eksplan pisang Barangan yang berupa sisir. Mahadev *et al.* (2011) bahkan melakukan subkultur berulang atau secara frekuentif setiap satu bulan dan melakukan empat tahap regenerasi, yaitu induksi tunas, elongasi tunas, multiplikasi tunas, dan induksi perakaran dengan menggunakan media yang berbeda-beda dalam meregenerasi irisan jantung.

Hasil penelitian menunjukkan perlakuan BA 25  $\mu\text{M}$  menghasilkan total tunas dan tunas normal lebih banyak daripada perlakuan lainnya, yaitu 9,2 tunas/eksplan dan 6 tunas/eksplan masing-masing (Tabel 3). Penampilan biakan pisang Barangan yang berasal dari eksplan aksis jantung dapat dilihat pada Gambar 2.

**Tabel 2.** Pengaruh taraf BA terhadap jumlah nodul dan tunas dari eksplan potongan melintang aksis jantung pisang Barangan pada 2,5 BST.

Taraf BA ( $\mu\text{M}$ )	Jumlah nodul	Jumlah tunas
5	0,4	0,0
10	0,8	0,0
15	0,6	0,0
20	1,2	0,5
25	2,1	0,0

Tidak terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar perlakuan berdasarkan uji lanjut DMRT 5%.

**Tabel 3.** Pengaruh taraf BA terhadap tunas yang terbentuk dari potongan melintang aksis jantung pisang Barangan setelah disubkultur ke media MS yang mengandung BA 10  $\mu\text{M}$  dan IAA 1  $\mu\text{M}$  pada 2,5 BSS.

Taraf BA ( $\mu\text{M}$ )	Jumlah total tunas	Jumlah tunas normal	Jumlah tunas abnormal	Jumlah tunas mati
5	9,0	0,8 a	8,2	0,8
10	7,8	0,0 a	7,8	1,5
15	4,2	0,5 a	3,7	1,0
20	8,5	1,7 a	6,8	1,7
25	9,2	6,0 b	3,2	0,4

Tidak terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar perlakuan terhadap peubah jumlah total tunas, jumlah tunas abnormal, dan jumlah tunas mati berdasarkan uji lanjut DMRT 5%. Huruf yang sama untuk peubah jumlah tunas normal menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata berdasarkan uji lanjut DMRT 5%.



**Gambar 2.** Pertumbuhan biakan pisang Barangan yang diinduksi dari potongan melintang aksis jantung. A = bakal tunas normal, B = bakal tunas abnormal, C = tunas-tunas yang normal.

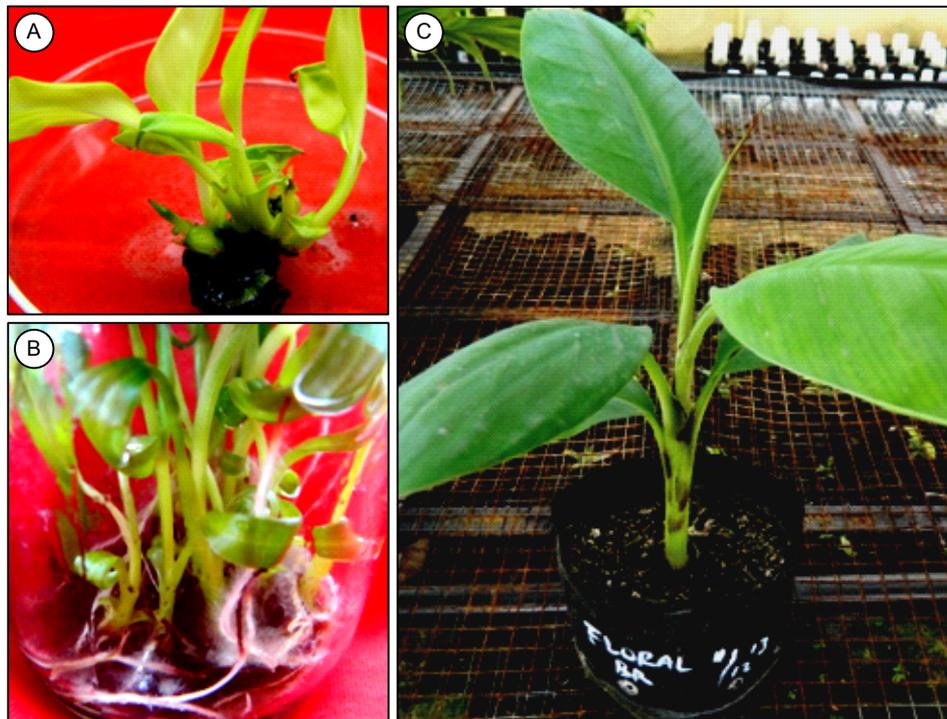
Hasil penelitian ini menunjukkan adanya dua tipe bakal tunas yang diregenerasikan dari potongan melintang aksis jantung, yaitu bakal tunas normal (Gambar 2A) dan abnormal (Gambar 2B). Tunas yang abnormal dicirikan dengan warna yang keputihan atau hijau tua dan tunas tidak mengalami elongasi dengan morfologi daun yang menyerupai kelopak bunga. Abnormalitas tersebut diduga dipengaruhi oleh keseimbangan pertumbuhan tunas yang belum sempurna. Keseimbangan pertumbuhan tersebut diperankan oleh fitohormon auksin (Taiz dan Zeiger, 2002). Pemberian sitokinin secara eksogen diduga dapat mengubah rasio sitokinin dan auksin endogen sehingga diperoleh tunas yang tidak seimbang pertumbuhannya.

Secara keseluruhan, faktor multiplikasi tunas yang dihasilkan pada penelitian ini lebih tinggi dibanding dengan yang telah dilakukan oleh Darvari *et al.* (2010) dan Mahadev *et al.* (2011). Darvari *et al.* (2010) dilaporkan mampu menghasilkan 13,5 tunas/sisir, sedangkan Mahadev *et al.* (2011) mampu menghasilkan 60 tunas/jantung. Pada penelitian ini, diperoleh 9,2 tunas/eksplan yang berasal dari setengah keping potongan aksis 2 mm. Dari jantung yang berukuran 15 cm, telah diperoleh 50 eksplan sehingga potensi multiplikasi tunas yang diperoleh pada penelitian ini adalah 460 tunas/jantung. Selain tingginya faktor multiplikasi tunas, penggunaan eksplan po-

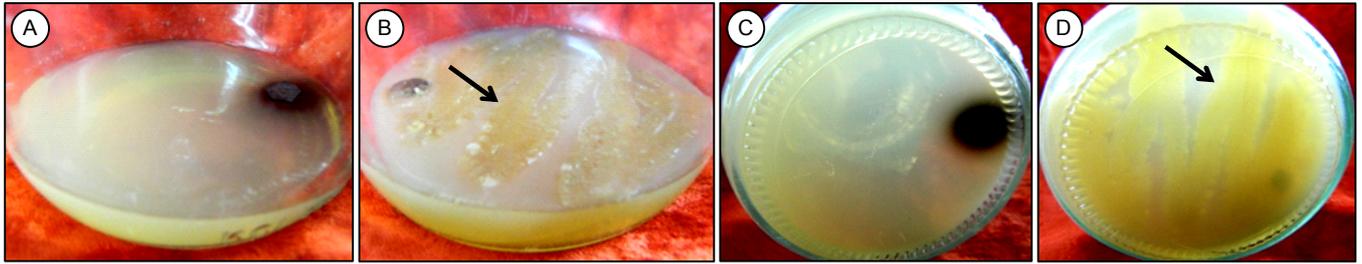
tongan melintang aksis jantung juga menghasilkan biakan yang bebas dari kontaminasi bakteri. Hasil aklimatisasi menunjukkan bahwa planlet yang berasal dari eksplan anakan dan potongan melintang aksis jantung memiliki tingkat keberhasilan aklimatisasi yang sama, yaitu 100%, dan memiliki morfologi yang sama. Penampilan biakan dan bibit pisang hasil regenerasi potongan melintang aksis jantung ditampilkan pada Gambar 3.

### Skrining Biakan dari Kontaminasi Bakteri

Hasil skrining biakan pada media pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa tunas-tunas yang diregenerasikan dari aksis jantung seluruhnya terbebas dari kontaminasi bakteri, sedangkan tunas-tunas yang diregenerasikan dari anakan seluruhnya terbukti terkontaminasi bakteri (Gambar 4), walaupun sebelumnya diduga terbebas dari kontaminasi bakteri berdasarkan pengamatan secara visual. Hasil penelitian ini bahkan lebih baik (100%) daripada yang diperoleh Iqbal *et al.* (2013) ketika antibiotik diaplikasikan pada tunas *in vitro* pisang, yaitu sefotaksim 200 mg/l selama 1 jam, yang menghasilkan 90% biakan steril. Van den Houwe *et al.* (1998) melaporkan bahwa pembebasan biakan pisang dari kontaminasi bakteri dapat dilakukan melalui teknik kultur meristem atau menggunakan antibiotik rifampisin 100 mg/l selama 1 bulan, dengan tingkat eliminasi sebesar 100%.



**Gambar 3.** Penampilan benih pisang Barangan yang diregenerasikan dari potongan melintang aksis jantung pada beberapa tahap pertumbuhan. A = tunas yang telah mengalami elongasi, B = planlet, C = bibit yang telah diaklimatisasi.



**Gambar 4.** Hasil skrining biakan pisang Barangan menggunakan media pertumbuhan bakteri. A dan C = berasal dari potongan melintang aksis jantung, B dan D = berasal dari eksplan anakan. Tanda panah menunjukkan massa bakteri.

Msogoya *et al.* (2012) juga melaporkan bahwa kontaminasi bakteri pada kultur *in vitro* pisang dapat diatasi dengan penggunaan gentamisin, rifampisin, dan kloramfenikol 150 mg/l. Namun demikian, dalam pemakaian antibiotik perlu diperhatikan dosis karena dosis yang tinggi dapat bersifat fitotoksik atau mematikan jaringan tanaman (Msogoya *et al.*, 2012; Van den Houwe *et al.*, 1998).

#### KESIMPULAN

Regenerasi aksis jantung pisang Barangan dipengaruhi oleh taraf BA. BA 25  $\mu$ M merupakan perlakuan yang terbaik karena menghasilkan jumlah total tunas dan tunas normal yang terbanyak, yaitu 9,2 tunas/eksplan dan 6 tunas/eksplan masing-masing. Semua tunas *in vitro* (100%) yang dihasilkan dari eksplan aksis jantung terbukti bebas dari kontaminasi bakteri, sedangkan semua yang berasal dari anakan terkontaminasi bakteri, walaupun pada awalnya tidak terdeteksi secara visual, sebelum dilakukan skrining. Potongan aksis jantung dapat menjadi sumber eksplan pisang yang bebas bakteri.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bhosale, U.P., S.V. Dubhashi, N.S. Mali, and H.P. Rathod. 2011. *In vitro* shoot multiplication in different species of banana. *Asian J. Plant Sci. Res.* 1(3):23–27.
- Buah, J.N., E. Danso, K.J. Taah, E.A. Abole, E.A. Bediako, J. Aseidu, and R. Baidoo. 2010. The effect of different concentration cytokinins on the *in vitro* multiplication of plantain (*Musa sp.*). *Biotech.* 9(3):343–347.
- Darvari, F.M., M. Sariah, M.P. Puad, and M. Maziah. 2010. Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa sp.*) cultivars using male flowers. *Afr. J. Biotechnol.* 9(16):2360–2366.
- Iqbal, M.M., A. Muhammad, I. Hussain, and H. Bilal. 2013. Optimization of *in vitro* micropropagation protocol for banana (*Musa sapientum* L.) under different hormonal concentrations and growth media. *IJAIR* 2(1):23–27.
- Jafari N., R.Y. Othman, and N. Khalid. 2011. Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Barangan. *Afr. J. Biotech.* 10(13):2446–2450.
- Khalil, S.M., K.T. Cheah, E.A. Perez, D.A. Gaskill, and J.S. Hu. 2002. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 20:1128–1134.
- Ko, W.H., C.C. Su, C.L. Chen, and C.P. Chao. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell Tiss. Org.* 96:137–141.
- Krikorian, A.D., H. Irizarry, S.S. Cronauer-Mitra, and E. Rivera. 1993. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa* sp.) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Ann. Bot.* 71:519–535.
- Krikorian, A.D., H. Irizarry, R. Goenaga, M.E. Scott, and B.E.L. Lockhart. 1999. Stability in plant and bunch traits of a 'French-type' dwarf plantain micropropagated from the floral axis tip and five lateral corm tips of a single mother plant: Good news on the tissue culture and bad news on *Banana streak virus*. *Sci. Hort.* 81:159–177.
- Madhulatha, P., M. Anbalagan, S. Jayachandran, and N. Sakthivel. 2004. Influence of liquid pulse treatment with growth regulators on *in vitro* propagation of banana (*Musa* sp. AAA). *Plant Cell Tiss. Org.* 76:189–191.
- Mahadev, S.R., A. Kathithachalam, and M. Marimuthu. 2011. An efficient protocol for large-scale plantlet production from male floral meristems of *Musa* spp. cultivars Virupakshi and Sirumalai. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47:611–617.
- Msogoya, T., H. Kanyagha, J. Mutigitu, M. Kulebelwa, and D. Mamiro. 2012. Identification and management of microbial contaminants of banana *in vitro* cultures. *J. Appl. Biosci.* 55:3987–3994.
- Nisyawati and K. Kariyana. 2013. Effect of ascorbic acid, activated charcoal and light duration on shoot regeneration of banana cultivar Barangan (*Musa acuminata* L.) *in vitro* culture. *IJRRAS* 15(1):13–17.
- Panis, B. 2009. Cryopreservation of *Musa* germplasm: 2nd edition. In: F. Engelmann and E. Benson, editors, Technical guidelines no. 9. Bioversity International. Montpellier, France.

- Resmi, L. and A.S. Nair. 2007. Plantlet production from the male inflorescence tips of *Musa acuminata* cultivars from South India. *Plant Cell Tiss. Org.* 88:333–338.
- Sakai, A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plant culture cells and meristem cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ . In: A. Sakai, editor, *Cryopreservation of plant genetic resources*. Japan International Cooperation Agency. Japan. p. 5–26.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. *Plant physiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates. Sunderland, UK.
- Van den Houwe, I., J. Guns, and R. Swennen. 1998. Bacterial contamination in *Musa* shoot tip cultures. *Acta Hort.* 490:485–492.
- Yombi, E., B. Ella, and K. Tomekpe. 2006. Effect of thidiazuron on *in vitro* proliferation capacities of some banana (*Musa* spp.) cultivars with weak multiplication potential. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 19(2):255–259.
-