
KOLEKSI PLASMA NUTFAH PISANG SECARA *EX VITRO* DAN *IN VITRO* SERTA KAJIAN SITOLOGI DAN ANALISA KERAGAMAN ANTAR KARAKTER BERDASARKAN PENANDA FENOTIPE

Fitri Damayanti¹ dan Ika Roostika²

¹Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Teknik, Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indraprasta, Jalan Nangka No. 58 Jakagaksa Jakarta

²Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A Bogor 16111

Abstract. Indonesia is the one of banana biodiversity center in the world. Genetic diversity of this plant is large. Thus, it is important to conserve these genetic resources to support banana breeding program. Collection of banana germplasm is more important due to over exploitation in the natural habitats in Indonesian forests without sufficient culture or replacement efforts. Studies on cytology and morphological characters of plants are required to avoid duplications of germplasm collections. This research would be explored 30 accession of Indonesian banana germplasms from East Borneo, Banjarmasin (South Borneo), field germplasms from Cibinong, Yogyakarta, Rembang, Purworejo, and Subang. There were 20 accession of germplasms collections that would succeed to collect in vitro. Chromosome analysis revealed different ploidies: diploid ($2n=2x=22$) and triploid ($2n=3x=33$). Related similarity in dendogram from ten accessions of banana (Rotan, Telunjuk, Emas, Hutan, Lampung, Api Merah, Api Hijau, Morosebo, Tanduk, and Barangan) based of vegetative and generative characters divided into four groups at 88.75% similarity; group I were accessions of Emas, Telunjuk, Rotan, and Hutan; accessions of Lampung and Morosebo were group II; group III was accession of Tanduk; and the last group were accessions of Api Merah, Api Hijau and Barangan. Result from in vitro experiment, induction of banana bud was depending of fenolic acid that results from specific variety, growth hormone concentration, and genome. Banana with A genome (diploid AA or triploid AAA) had the best growth because the result of fenolic acid was lower. Culture media with 5 ppm BAP was elevating in vitro bud of banana germplasm that have more number of A genome. The banana whose have more number of B genome was need higher concentration of BAP. Ambon Kuning whose have AAA genome had the higher multiplication of bud rather than Api Hijau and Api Merah whose have AAB genome or Kepok Kuning with ABB genome.

Key words: genome, chromosome, *Musa* spp., ploidy, stomata

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu pusat keanekaragaman hayati di dunia (*megabiodiversity*). Salah satu tanaman dengan tingkat keragaman genetik yang tinggi adalah pisang. Plasma nutfah pisang memegang peranan penting dalam program pemuliaan sebagai sumber material genetik untuk menciptakan jenis unggul atau kultivar baru. Sebagai konsekuensi pembangunan, keberadaan plasma nutfah pisang terus

menurun dan pada akhirnya akan terjadi kepunahan. Oleh karena itu plasma nutfah perlu dilestarikan dan dikembangkan untuk mempertahankan keanekaragaman hayati. Salah satu teknik konservasi yang dapat diterapkan pada tanaman pisang adalah konservasi *in vitro*.

Tanaman pisang yang ada sekarang diduga merupakan keturunan dari *M. acuminata* dan atau *M. balbisiana* yang mempunyai jumlah kromosom $2n=22$.

Tanaman pisang mempunyai tingkat ploidi yang beragam. Hal ini terjadi karena persilangan-persilangan alami dari pisang-pisang spesies liar yang terus menerus berlangsung dan adanya pengaruh lingkungan sehingga tercipta jenis tanaman baru yang bersifat diploid, triploid dan tetraploid. *M. acuminata* mempunyai genom yang dilambangkan oleh huruf A, sedangkan *M. balbisiana* dilambangkan dengan huruf B. Pisang-pisang yang dikonsumsi mempunyai genom AA, AB, dan mungkin BB, triploid AAA, AAB, ABB, dan BBB, serta tetraploid AAAA, AAAB, AABB, dan ABBB.

Sebelum penerapan konservasi *in vitro*, terlebih dahulu dilakukan karakterisasi terhadap koleksi plasma nutfah pisang yang ada, baik karakterisasi morfologi, anatomi, dan genetik. Kegiatan ini dilakukan untuk menghindari terjadinya duplikasi pada koleksi. Pisang yang ada belum seluruhnya terkarakterisasi sehingga kemungkinan masih banyak sumber potensi keragaman genetik pisang yang belum diketahui. Informasi sifat genetik, seperti tingkat ploidi dan jenis genom dan ciri sitologi diperlukan dalam mendukung program pemuliaan tanaman. Koleksi plasma nutfah yang ada juga perlu dilakukan analisa keragaman hubungan kekerabatan di antara plasma nutfah pisang untuk program pemuliaan tanaman dan manajemen konservasi plasma nutfah pisang.

Keberhasilan konservasi *in vitro* adalah dikuasainya teknik regenerasi *in vitro*. Teknik regenerasi yang optimal merupakan kunci awal keberhasilan penerapan teknik konservasi yang sangat diperlukan dalam penyediaan bahan tanaman dalam jumlah yang memadai dan dalam proses pemulihan dan pertumbuhan biakan setelah penyimpanan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengoleksi plasma nutfah pisang secara *ex vitro* dan *in vitro*, mempelajari ciri sitologi dan hubungan kekerabatan, serta mendapatkan formulasi media terbaik untuk regenerasi pisang.

METODE PENELITIAN

Tahapan kegiatan dalam penelitian ini adalah: 1) koleksi plasma nutfah pisang,

2) kajian sitologi yang meliputi analisa jumlah kromosom dan karakter stomata, 3) analisa hubungan kekerabatan pada beberapa plasma nutfah pisang, 4) penanaman secara *in vitro* (sterilisasi bahan tanaman dan induksi tunas *in vitro*).

1. Koleksi Plasma Nutfah Pisang

Bahan yang dikoleksi adalah hasil eksplorasi dan pertukaran plasma nutfah dari kebun koleksi pisang-pisangan yang sudah ada (Kebun Koleksi Cibinong, Purwodadi, Yogyakarta, Subang, dan Rembang). Kegiatan eksplorasi diutamakan pada plasma nutfah pisang yang langka sedangkan kultivar yang biasa dibudidayakan petani menjadi prioritas terakhir. Koleksi pisang yang ada kemudian diamati karakter morfologinya (fase vegetatif dan generatif). Pengamatan karakter morfologi dilakukan untuk menentukan genom *M. acuminata* dan *M. balbisiana* yang dilakukan dengan menggunakan sistem skoring dari 15 karakter morfologi yang diamati berdasarkan Simmonds dan Shepherd (Simmonds, 1959). Lima belas karakter morfologi yang diamati empat karakter adalah karakter pada fase vegetatif dan sebelas karakter pada fase generatif. Dari hasil nilai skor yang diperoleh dapat diketahui genom dan tingkat ploidi dari masing-masing kultivar.

2. Kajian Sitologi

Ciri sitologi dilakukan dengan analisa jumlah kromosom dan stomata, kegiatan ini baru dilakukan pada 10 aksesori pisang. Analisa jumlah kromosom dilakukan dengan menggunakan metode *squash* yang diaplikasi dari Darnaedi (1990). Akar dipotong sepanjang 1 cm dari ujung akar dan dimasukkan ke dalam larutan hidroksiquinolin 0.002 M 0.8 selama 3-5 jam pada suhu 18-20°C. Kemudian akar difiksasi dalam etanol:asam asetat glasial (3:1) selama 48 jam, kemudian direndam dalam larutan asam asetat 45% selama 10 menit. Pewarnaan preparat dilakukan dengan menggunakan orcein 2% selama 10 menit di atas gelas objek, kemudian ditutup, dan ditekan. Setiap individu tanaman dipilih beberapa sel terpilih yaitu sel yang menunjukkan fase metafase, tidak terjadi tumpang tindih antar sel maupun antar

kromosom. Pada fase tersebut kromosom tampak menyebar, sehingga memudahkan dalam pengamatan.

Pengamatan stomata dilakukan untuk melihat hubungan tingkat ploidi dengan ukuran stomata pada beberapa plasma nutfah pisang. Sediaan mikroskopis untuk pengamatan anatomi stomata berupa sayatan membujur (paradermal). Pembuatan sayatan paradermal menggunakan metode utuh (whole mount) yang diwarnai dengan safranin 1% (Sass, 1951). Daun difiksasi dalam alkohol 70% kemudian direndam dalam larutan HNO₃ 20% selama 3-4 jam agar lapisan epidermis mudah dilepaskan dari jaringan mesofil. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Karakter anatomi yang diamati adalah bentuk, kerapatan stomata, panjang dan lebar sel penjaga stomata, ukuran sel epidermis, luas serta indeks stomata. Data kerapatan dan ukuran sel epidermis, kerapatan stomata dan indeks stomata yang diperoleh merupakan nilai rata-rata dari pengukuran lima bidang pandang yang dipilih secara acak masing-masing dengan lima ulangan

3. Analisa Keragaman antar Karakter Berdasarkan Penanda Fenotipe pada Beberapa Koleksi Plasma Nutfah Pisang

Pada tahap ini dilakukan analisa keragaman antar karakter berdasarkan pengamatan morfologi pada beberapa aksesori plasma nutfah pisang. Aksesori yang diuji pada tahapan ini adalah aksesori yang sudah memasuki fase generatif (ada 10 aksesori pisang). Aksesori pisang yang diamati adalah tanaman yang telah berjanjang. Organ tanaman yang diamati meliputi 7 karakter tangkai bunga, 4 karakter jantung, 10 karakter braktea, dan 39 karakter buah. Pengamatan dilakukan berdasarkan deskripsi dari Plant Descriptor yang disusun oleh Internasional Board for Plant Genetic Resource (IBPGR, 1984). Data hasil pengamatan akan dianalisa dengan menggunakan program Minitab. Hasil

analisis kemiripan terjadi dalam bentuk dendrogram.

4. Penanaman secara *in Vitro* *Sterilisasi Bahan Tanaman*

Bahan tanaman awal yang digunakan sebagai eksplan (untuk penanaman *in vitro*) adalah berupa bonggol yang mengandung beberapa mata tunas. Sebelum sterilisasi, bonggol direndam dalam larutan fungisida minimal selama 3 jam, kemudian disterilisasi dengan alkohol 70% selama 15–20 menit, HgCl₂ 0,2% selama 3 menit, Clorox 30% selama 20–30 menit, dan Clorox 20% selama 20-30 menit.

Induksi Tunas in Vitro

Untuk menginduksi tunas *in vitro*, bonggol dari setiap aksesori pisang ditanam pada media Murashige and Skoog (MS) yang diperkaya dengan BAP 5 mg/l dan ditambahkan polivinilpirolidon (PVP) 100 mg/l untuk menghambat pencoklatan (*browning*). Secara rutin, bonggol akan dipindahkan (disubkultur) ke media segar untuk mempercepat inisiasi tunas. Apabila BA tidak sesuai untuk inisiasi maka digunakan jenis sitokinin lainnya, seperti zeatin.

HASIL DAN PEMBAHASAN Koleksi Plasma Nutfah Pisang

Koleksi plasma nutfah pisang yang diperoleh adalah hasil eksplorasi dan pertukaran plasma nutfah dari kebun koleksi pisang-pisangan yang sudah ada. Eksplorasi pisang dilakukan di beberapa daerah di Kalimantan Timur (Malinau, Penajam, Bulungan, dan Samarinda). Koleksi plasma nutfah hasil pertukaran diperoleh dari daerah Banjarmasin (Kalimantan Selatan), Kebun Koleksi di Cibinong (Bogor), Yogyakarta, Rembang, Purworejo dan Subang. Dari kegiatan ini berhasil dikoleksi sebanyak 30 aksesori plasma nutfah pisang (Tabel 1). Koleksi plasma nutfah pisang tersebut ditanam di rumah kaca sebagai koleksi sementara yang digunakan sebagai sumber tanaman induk dalam kegiatan penanaman *in vitro*.

Tabel 1. Aksesori pisang yang telah dikoleksi dan asal daerah

No.	Aksesori	Asal Daerah
1.	Rotan	
2.	Telunjuk	Malinau (Kaltim)
3.	Mas Samarinda	
4.	Hutan	
5.	Api Merah	Bulungan (Kaltim)
6.	Api Hijau	
7.	Morosebo	Penajam (Kaltim)
8.	Barangan	
9.	Kapas	Samarinda (Kaltim)
10.	Tanduk	
11.	Awa	
12.	Manurun	Banjarmasin (Kalsel)
13.	Mahuli	
14.	Ambon Kuning	
15.	Lampung	Bogor
16.	Uli	
17.	Gendruwo	
18.	Kepok Putih	
19.	Kepok Kuning	Purworejo
20.	Rajasereh	
21.	Rojokawisto	
22.	Romo	
23.	Susu Besar	
24.	Susu Birik	
25.	Gablok	Rembang
26.	Kidang	
27.	Byar	
28.	Ulin	
29.	Kepok Kuning Yogya	Yogyakarta
30.	Manalagi	Subang

Penentuan genom baru dapat dilakukan terhadap 10 aksesori (pisang Rotan, Telunjuk, Mas Samarinda, Hutan, Api Merah, Api Hijau, Morosebo, Barangan, Lampung, dan Tanduk) yang telah memasuki fase generatif, untuk aksesori pisang lain belum dilakukan karena masih dalam fase vegetatif. Penentuan genom dilakukan untuk membedakan antara genom *M. acuminata* dan *M. balbisiana* berdasarkan 15 karakter morfologi (Simmonds, 1959). Hasil penentuan genom dapat dilihat pada Tabel 2.

Kajian Sitologi

Pengamatan jumlah kromosom

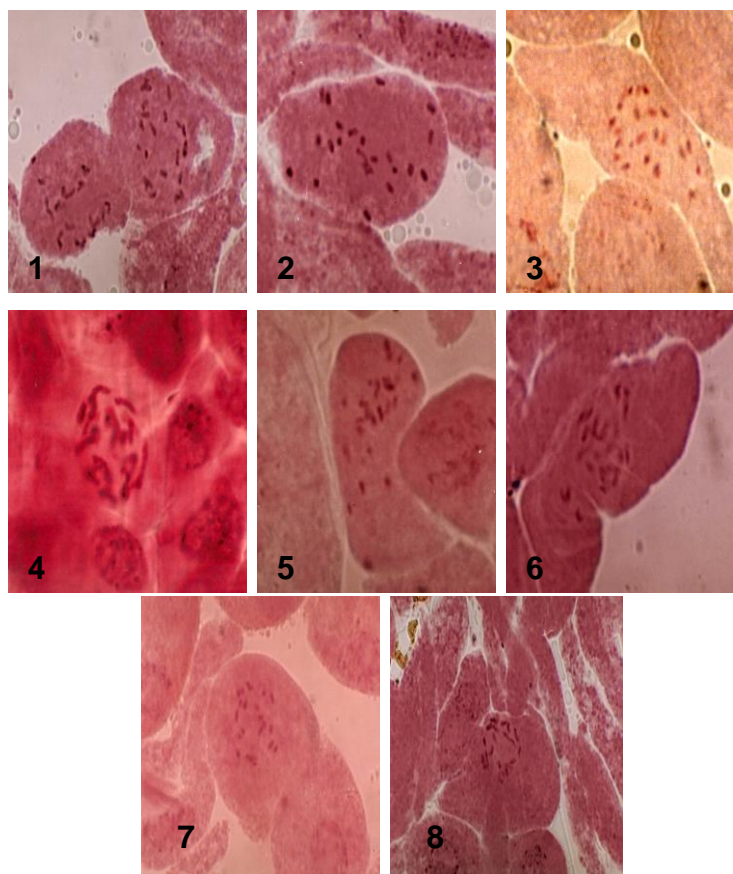
Hasil pengamatan jumlah kromosom pada sel somatik terhadap sepuluh aksesori plasma nutfah pisang adalah 22 dan 33

(Gambar 1 dan Tabel 2). Jumlah kromosom untuk pisang Rotan, Telunjuk, Emas, Lampung, dan Hutan adalah diploid $2n=2x=22$, sedangkan pisang Barangan, Api Merah, Api Hijau, Tanduk, dan Morosebo adalah triploid $2n=3x=33$. Darlington and Wylie (1955) menyatakan bahwa jumlah kromosom dasar untuk pisang-pisangan adalah $x=11$ dengan tingkat ploidi yang beragam yaitu diploid ($2n=22$), triploid ($2n=33$) dan tetraploid ($2n=44$). Menurut Simmonds (1959), tingkat ploidi yang beragam pada tanaman pisang terjadi karena persilangan-persilangan alami dan pengaruh lingkungan sehingga tercipta jenis tanaman baru yang bersifat diploid, triploid dan tetraploid.

Tabel 2. Hasil pengamatan morfologi untuk penentuan tingkat ploidi dan genom pada beberapa koleksi pisang

No.	Aksesi	Jumlah Kromosom	Ploidi	Skor	Genom
1.	Rotan	22	2n=2x	23	AA
2.	Telunjuk	22	2n=2x	23	AA
3.	Emas	22	2n=2x	22	AA
4.	Hutan	22	2n=2x	19	AA
5.	Lampung	22	2n=2x	22	AA
6.	Api merah	33	2n=3x	31	AAB
7.	Api hijau	33	2n=3x	27	AAB
8.	Morosebo	33	2n=3x	19	AAA
9.	Barangan	33	2n=3x	19	AAA
10.	Tanduk	33	2n=3x	26	AAB
11.	Kapas	33	2n=3x	-	-
12.	Manalagi	33	2n=3x	-	-
13.	Rajasereh	33	2n=3x	-	-
14.	Kepok kuning	33	2n=3x	-	-
15.	Ambon kuning	33	2n=3x	-	-

Keterangan: - koleksi masih dalam fase vegetatif

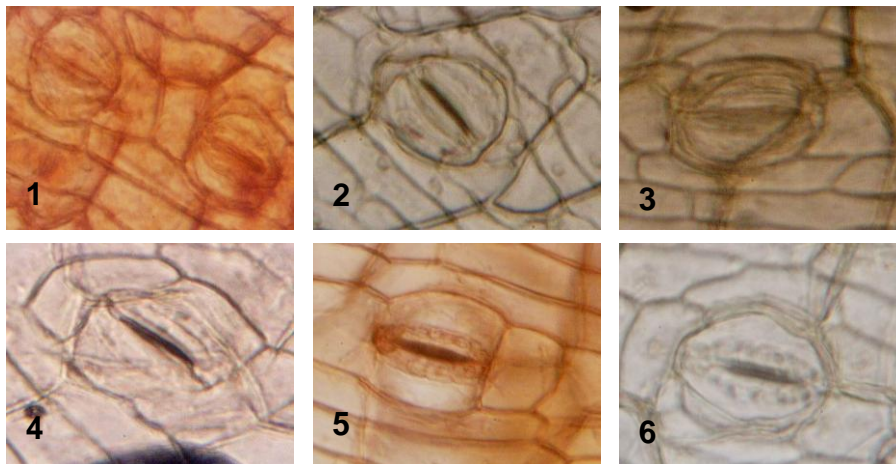


Gambar 1. Hasil pengamatan jumlah kromosom pada beberapa plasma nuttall pisang. 1) Pisang Rotan=2n=2x=22, 2) Pisang Telunjuk=2n=2x=22, 3) Pisang Mas Samarinda=2n=2x=22, 4) Pisang Hutan=2n=2x=22, 5) Pisang Api Merah=2n=3x=33, 6) Pisang Morosebo=2n=3x=33, 7) Pisang Api Hijau 2n=3x=33, dan 8) Pisang Lampung 2n=2x=22.

Taksonomi pisang masih belum jelas, beberapa jenis yang diperkirakan spesies ternyata merupakan hibrid atau hanya klon. Seperti halnya *M. sapientum* L. ternyata merupakan hibrid dari *M. paradisiaca* L. Nama sebenarnya adalah *Musa* sp. (golongan AAB) karena merupakan hibrid triploid dengan dua set genom dari *M. acuminata* (AA) dan satu genom dari *M. balbisiana* (BB) (Keng, 1969). Masalah lain yang dihadapi dalam taksonomi pisang adalah mengenai penyebutan klon-klon pisang di Asia Tenggara. Pada banyak kasus, masing-masing negara memiliki sebutan yang berbeda untuk klon-klon yang sama.

Pengamatan Stomata

Hasil sayatan paradermal permukaan atas dan bawah daun pisang menunjukkan sel-sel epidermis berbentuk heksagonal dan stomata berbentuk ginjal bertipe anomositik dengan letak berderet beraturan (Gambar 2). Menurut Sutrian (1996); Willmer (1983), pada daun dengan sistem pertulangan menjala, stomata menyebar tidak teratur sedangkan pada daun dengan sistem pertulangan sejajar seperti pada *Gramineae*, stomata tersusun dalam barisan yang sejajar. Pada kebanyakan tumbuhan kecuali *Gramineae* dan *Cyperaceae* sel penjaga secara umum berbentuk ginjal. Pengamatan stomata pada sepuluh aksesori plasma nutfah pisang dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 2. Hasil pengamatan anatomi stomata pada enam aksesori pisang 1) pisang Rotan, 2) pisang Telunjuk, 3) pisang Emas, 4) pisang Hutan, 5) pisang Barangan, dan 6) pisang Morosebo.

Pisang Morosebo memiliki ukuran sel epidermis dan stomata lebih besar dan terkecil adalah pisang Hutan. Hasil penelitian ini terlihat adanya kecenderungan untuk pisang dengan tingkat ploidi triploid mempunyai ukuran sel epidermis lebih besar dari pisang dengan tingkat ploidi diploid.

Pengamatan stomata pada sayatan paradermal daun pisang terdapat pada

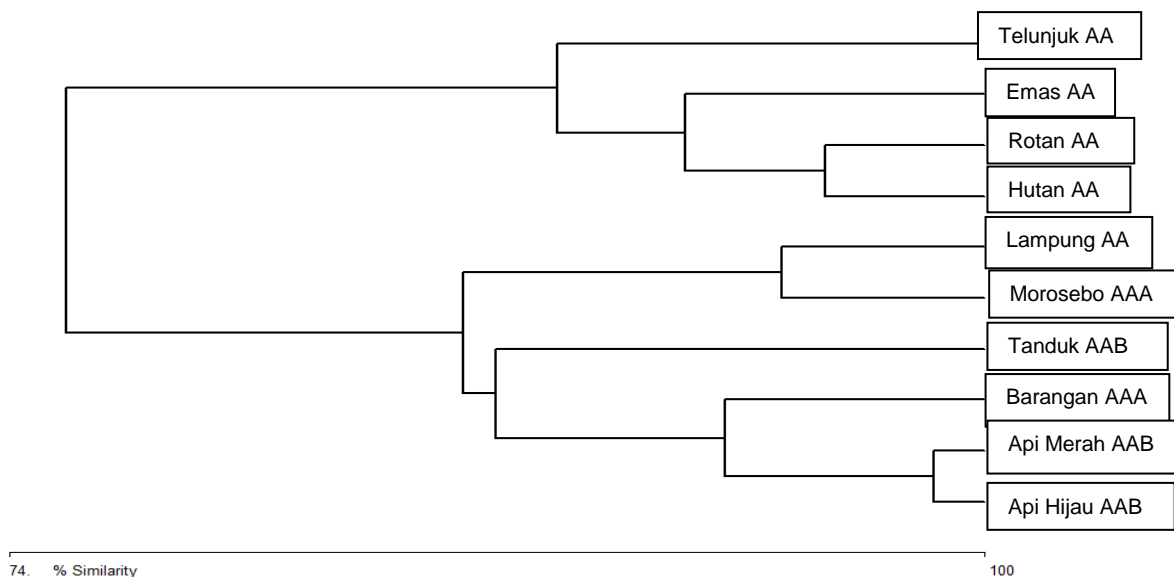
permukaan atas dan bawah kecuali pada pisang Hutan yang hanya terdapat pada permukaan bawah. Hal ini sesuai dengan pendapat Sutrian (1996), umumnya stomata terdapat pada kedua permukaan atau hanya terdapat pada satu permukaan saja yaitu pada permukaan bagian bawah.

Tabel 3. Kisaran nilai dan nilai rata-rata peubah anatomi sepuluh aksesi plasma nutfah pisang

No.	Peubah Anatomi	Aksesi									
		Pisang Rotan		Pisang Telunjuk		Pisang Emas		Pisang Hutan		Pisang Lampung	
		Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata	Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata	Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata	Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata	Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata
1.	Panjang sel apidermis atas (mm)	0.54-1.08	0.83±0.09	0.78-0.95	0.87±0.02	0.43-1.03	0.79±0.06	0.43-0.60	0.53±0.04	0.72-1.01	0.85±0.04
2.	Panjang sel epidermis bawah (mm)	0.51-0.68	0.62±0.02	0.43-0.70	0.57±0.05	0.51-0.65	0.57±0.03	0.24-0.34	0.29±0.02	0.60-0.87	0.73±0.04
3.	Lebar sel epidermis atas (mm)	0.27-0.41	0.30±0.01	0.35-0.51	0.43±0.02	0.27-0.51	0.38±0.01	0.29-0.38	0.34±0.04	0.31-0.41	0.37±0.01
4.	Lebar sel epidermis bawah (mm)	0.27-0.35	0.28±0.01	0.19-0.35	0.24±0.01	0.22-0.30	0.26±0.00	0.14-0.26	0.19±0.02	0.22-0.36	0.27±0.01
5.	Panjang stomata atas (mm)	0.27-0.38	0.33±0	0.27-0.38	0.25±0.02	0.27-0.38	0.34±0.02	-	-	0.24-0.31	0.29±0.01
6.	Panjang stomata bawah (mm)	0.27-0.32	0.30±0	0.27-0.38	0.33±0.00	0.27-0.32	0.30±0.01	0.24-0.34	0.28±0.02	0.24-0.36	0.32±0.03
7.	Lebar stomata atas (mm)	0.22-0.32	0.28±0.01	0.27-0.32	0.29±0.004	0.22-0.35	0.31±0.03	-	-	0.12-0.27	0.17±0.01
8.	Lebar stomata bawah (mm)	0.24-0.32	0.28±0.02	0.27-0.35	0.32±0.01	0.22-0.32	0.27±0.02	0.14-0.19	0.17±0.01	0.14-0.29	0.21±0.03
9.	Kerapatan stomata atas (jml/mm ²)	1528.66-2038.22	1698.51	1019.11-2547.77	1528.66	2547.77-4076.43	3227.18	-	-	2500.00-3333.33	3058.33
10.	Kerapatan stomata bawah (ml/mm ²)	9681.53-11719.75	11040.34	12229.30-14777.07	13757.96	16305.73-16815.29	16475.58	15833.33-18333.33	17222.22	15833.33-18333.33	16941.67
11.	Indeks stomata atas		3.40%		3.25%		6.44%	-	-		5.50%
12.	Indeks stomata bawah		12.36%		21.43%		19.28%		15.35%		26.07%
13.	Jumlah sel tetangga	4-6		4-5		5-6		4-6		4-5	

Tabel 3. Kisaran nilai dan nilai rata-rata peubah anatomi sepuluh aksesi plasma nutfah pisang (lanjutan)

No.	Peubah Anatomi	Aksesi									
		Pisang Api Merah		Pisang Api Hijau		Pisang Morosebo		Pisang Barangan		Pisang Tanduk	
		Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata	Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata	Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata	Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata	Kisaran Nilai	Nilai Rata-rata
1.	Panjang sel apidermis atas (mm)	0.84-1.08	0.99±0.02	0.72-0.84	0.75±0.01	0.81-1.08	0.93±0.03	0.65-1.19	0.87±0.06	0.48-0.72	0.60±0.05
2.	Panjang sel epidermis bawah (mm)	0.72-0.84	0.78±0.02	0.48-0.69	0.58±0.03	0.41-0.81	0.67±0.07	0.51-1.05	0.75±0.05	0.48-0.72	0.64±0.04
3.	Lebar sel epidermis atas (mm)	0.31-0.48	0.41±0.03	0.38-0.46	0.41±0.01	0.30-0.43	0.33±0.19	0.32-0.60	0.46±0.04	0.24-0.43	0.29±0.03
4.	Lebar sel epidermis bawah (mm)	0.29-0.43	0.34±0.03	0.19-0.31	0.25±0.02	0.35-0.46	0.40±0.00	0.16-0.24	0.20±0.00	0.24-0.43	0.30±0.03
5.	Panjang stomata atas (mm)	0.29-0.34	0.31±0.01	0.24-0.34	0.27±0.03	0.30-0.49	0.39±0.03	0.24-0.38	0.32±0.00	0.29-0.31	0.30±0.04
6.	Panjang stomata bawah (mm)	0.27-0.31	0.29±0.01	0.26-0.37	0.30±0.01	0.32-0.41	0.36±0.01	0.30-0.41	0.34±0.01	0.24-0.43	0.29±0.03
7.	Lebar stomata atas (mm)	0.14-0.24	0.20±0.01	0.17-0.22	0.19±0.03	0.27-0.41	0.32±0.02	0.14-0.27	0.18±0.01	0.14-0.17	0.16±0.05
8.	Lebar stomata bawah (mm)	0.12-0.19	0.17±0.02	0.17-0.24	0.21±0.01	0.30-0.41	0.34±0.01	0.27-0.38	0.31±0.02	0.12-0.22	0.17±0.02
9.	Kerapatan stomata atas (jml/mm ²)	2500.00-5000.00	3333.30	1666.67-3333.333	2500.00	1528.66-2038.22	1698.51	1528.66-2547.77	1868.37	0.00-833.33	558.33
10.	Kerapatan stomata bawah (ml/mm ²)	15000.00-19166.67	16944.44	16666.67-20833.33	18608.33	9171.97-12229.30	10191.08	7133.76-8152.87	7813.16	13333.33-16666.67	12500.00
11.	Indeks stomata atas		8.28%		6.87%		3.95%		5.42%		1.23%
12.	Indeks stomata bawah		28.50%		39.65%		17.39%		10.39%		22.96%
13.	Jumlah sel tetangga	4		4		4-6		4		4-5	



Gambar 3. Dendogram hubungan kekerabatan sepuluh aksesori plasma nutfah pisang

Masing-masing aksesori pisang menempati kelompok dengan nilai koefisien kekerabatan tertentu (Tabel 4). Koefisien kekerabatan menggambarkan dekat atau tidaknya kekerabatan dari aksesori-aksesori plasma nutfah pisang yang diamati. Pisang Api Hijau memiliki kekerabatan paling dekat dengan Api Merah dengan nilai koefisien kekerabatan sebesar 0.986. Hampir semua ciri morfologi yang bersifat kualitatif dan kuantitatif yang terdapat pada Api Hijau terdapat pula pada Api Merah. Aksesori pisang Barangan berkerabat dekat dengan Api Merah dan Api Hijau dengan nilai koefisien kekerabatan berturut-turut sebesar 0.931 dan 0.945. Hubungan kekerabatan terjauh dimiliki oleh pisang Tanduk dan Emas dengan nilai koefisien kekerabatan sebesar 0.756.

Pada dendogram terlihat bahwa pengelompokan terbentuk berdasarkan tingkat ploidi. Di mana pada kelompok I terdiri dari jenis pisang dengan tingkat ploidi diploid bergenom AA kecuali pada pisang Lampung yang berkerabat lebih dekat dengan Morosebo yang bergenom AAA dengan tingkat ploidi triploid. Pada kelompok II, III dan IV terlihat bahwa aksesori-aksesori yang memiliki komposisi genom yang sama ternyata tidak semua mengelompok dalam kelompok yang sama. Misalnya pisang Barangan yang bergenom AAA ternyata berkerabat lebih dekat dengan Api Merah dan Api Hijau yang bergenom AAB daripada pisang Morosebo yang bergenom AAA.

Tabel 4. Nilai koefisien kekerabatan sepuluh aksesori plasma putfah pisang

	Api Hijau	Api Merah	Tanduk	Hutan	Emas	Rotan	Telunjuk	Morosebo	Lampung	Barangan
Api Hijau	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Api Merah	0.986	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tanduk	0.874	0.869	*	*	*	*	*	*	*	*
Hutan	0.794	0.798	0.759	*	*	*	*	*	*	*
Emas	0.792	0.796	0.756	0.939	*	*	*	*	*	*
Rotan	0.829	0.833	0.772	0.958	0.920	*	*	*	*	*
Telunjuk	0.832	0.816	0.777	0.899	0.886	0.940	*	*	*	*
Morosebo	0.875	0.861	0.867	0.755	0.763	0.769	0.804	*	*	*
Lampung	0.900	0.904	0.873	0.771	0.789	0.796	0.821	0.946	*	*
Barangan	0.945	0.931	0.889	0.800	0.809	0.836	0.860	0.909	0.935	*

Penanaman secara *in Vitro* Sterilisasi Bahan Tanaman

Eksplan yang digunakan untuk penanaman *in vitro* adalah berupa bonggol yang mengandung beberapa mata tunas. Penanaman *in vitro* baru dilakukan terhadap 20 aksesi plasma nutfah, 10 aksesi baru dikoleksi di lapangan (*ex vitro*) karena terbatasnya anakan yang dimiliki (Tabel 5). Dari penelitian yang telah dilakukan, teknik terbaik yang diperoleh untuk sterilisasi eksplan adalah eksplan direndam dalam larutan Benlate selama satu malam, kemudian direndam dalam larutan Agrep (Streptomycin) minimal selama 3 jam. Setelah itu, bonggol disterilisasi dengan alkohol 70% selama 5 menit, HgCl₂ 0,2% selama 3 menit, Clorox 30% selama 10 menit, dan Clorox 20% selama 15 menit.

Eksplan ditanam pada media kultur tanpa penambahan zat pengatur tumbuh

(tahap persiapan) dengan tujuan mengusahakan kondisi yang aseptik/bebas kontaminasi. Faktor yang mempengaruhi kondisi aseptik dalam kultur adalah terjadinya kontaminasi baik oleh bakteri maupun jamur. Bahan tanaman berupa bonggol sangat rawan terjadi kontaminasi sehingga sulit untuk mendapatkan eksplan yang steril. Sterilisasi terlalu keras dapat mematikan jaringan, jika sterilisasi kurang sempurna bakteri eksternal akan muncul dalam 1 atau 2 hari setelah inokulasi eksplan. Bakteri internal dapat muncul setelah beberapa kali subkultur. Kontaminasi oleh jamur lebih berbahaya dari pada bakteri yang baru terlihat 2 minggu setelah tanam dan sporanya mudah sekali menyebar apalagi didukung keadaan lingkungan yang kurang aseptik.

Tabel 5. Daftar koleksi plasma nutfah pisang secara *ex vitro* dan *in vitro*

No.	Aksesi/Asal Daerah	Jumlah Biakan (Botol)/Anakan	Keterangan
1.	Ambon kuning (Bogor)	12	Multiplikasi (10 botol) dan elongasi (2 botol)
2.	Lampung (Bogor)	7	Belum terinduksi
3.	Uli (Bogor)	5	Belum terinduksi
4.	Mas Samarinda (Malinau)	2	Inisiasi (1 botol) dan multiplikasi (1 botol)
5.	Telunjuk (Malinau)	3	Belum terinduksi
6.	Rotan (Malinau)	2	Inisiasi tunas
7.	Hutan (Bulungan)	3	Multiplikasi
8.	Api Hijau (Bulungan)	1	Inisiasi
9.	Api Merah (Bulungan)	1	Inisiasi
10.	Morosebo (Penajam)	8	Inisiasi (2 botol)
11.	Barangan (Samarinda)	5	Multiplikasi
12.	Kapas (Samarinda)	2*	<i>Ex vitro</i>
13.	Tanduk (Samarinda)	5	Multiplikasi
14.	Awa (Banjarmasin)	1*	<i>Ex vitro</i>
15.	Manurun (Banjarmasin)	1*	<i>Ex vitro</i>
16.	Mahuli (Banjarmasin)	1*	<i>Ex vitro</i>
17.	Romo (Purworejo)	5	Belum terinduksi
18.	Gendruwo (Purworejo)	8	Inisiasi (1 botol) – induksi tunas (6)
19.	Kepok Putih (Purworejo)	2	Belum terinduksi
20.	Kepok Kuning (Purworejo)	2	Belum terinduksi
21.	Raja Sereh (Purworejo)	2	Multiplikasi (1 botol)
22.	Rojo Kawisto (Purworejo)	1*	<i>Ex vitro</i> (mirip kepok kuning)
23.	Susu Besar (Rembang)	2*	<i>Ex vitro</i> (ukuran buah besar)
24.	Susu Birik (Rembang)	2*	<i>Ex vitro</i> (kulit buah berbintik-bintik)
25.	Gablok (Rembang)	2*	<i>Ex vitro</i> (bentuk buah seperti kepok tetapi lebih besar dan berwarna kuning terang)

26.	Kidang (Rembang)	2*	<i>Ex vitro</i> (kulit buah berwarna merah)
27.	Byar (Rembang)	2	Inisiasi (tidak berjantung dan buahnya berukuran besar)
28.	Ulin (Rembang)	2*	<i>Ex vitro</i> (mirip buah pisang mas tetapi ujungnya runcing)
29.	Kepok Kuning (Yogyakarta)	1	Belum terinduksi
30.	Manalagi (Subang)	1	Inisiasi, sulit bermultiplikasi

Keterangan: * = belum ditanam secara *in vitro*

Inisiasi dan Multiplikasi Tunas

Kecepatan pertumbuhan dan jumlah tunas yang dihasilkan dari masing-masing aksesori pisang sangat beragam berkisar antara 8-10 minggu. Dalam penelitian ini terlihat bahwa keberhasilan inisiasi tunas *in vitro* dan tingkat multiplikasi pada kultur pisang berbeda-beda untuk setiap aksesori pisang. Daya regenerasi dan multiplikasi dipengaruhi oleh spesifikasi aksesori yaitu genom dan tingkat ploidi. Pada kultur pisang Ambon Kuning dengan tingkat triploid AAA memiliki jumlah tunas yang paling banyak. Sedangkan untuk kultur pisang yang memiliki genom AAB cenderung sulit untuk berinisiasi. Terlihat bahwa genom B bersifat menghambat inisiasi dan regenerasi tunas. Secara umum, keberadaan gen B dalam susunan genom berpengaruh menghambat terbentuknya tunas pada tahap permulaan atau inisiasi.

Dari hasil yang diperoleh kecepatan pertumbuhan biakan pisang *in vitro* juga dipengaruhi oleh faktor senyawa fenol yang dikeluarkan oleh aksesori pisang tersebut dan penggunaan zat pengatur tumbuh. Persenyawaan fenol yang dikeluarkan disebabkan dari pengaruh masing-masing aksesori pisang yang menyebabkan browning atau pencoklatan pada media apabila senyawa fenol yang dikeluarkan berlebih dapat menyebabkan kematian kultur pisang. Jenis genom berperan dalam proses keluarnya persenyawaan fenol. Aksesori pisang yang mengandung genom A pada ploidy (diploid AA atau triploid AAA) umumnya menghasilkan senyawa fenol lebih sedikit dibandingkan dengan aksesori yang mengandung genom B pada ploidy

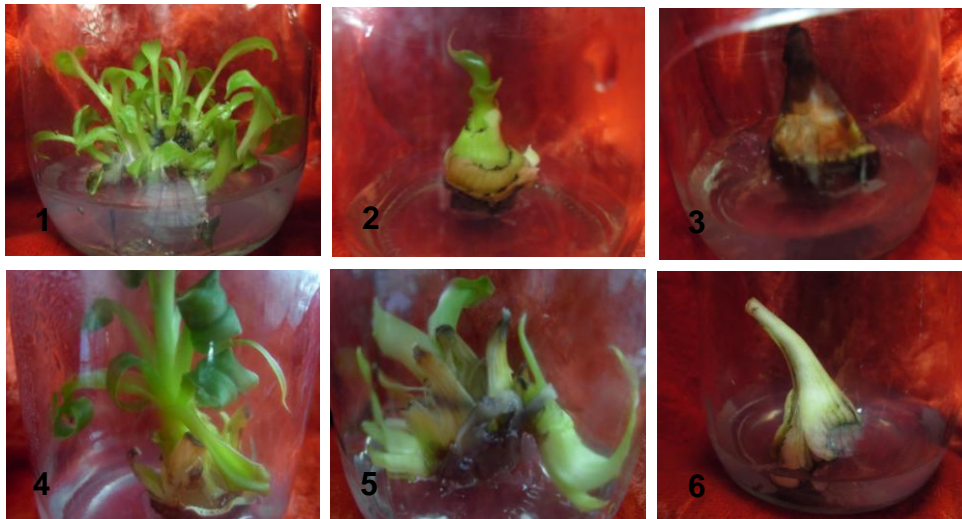
(diploid BB atau triploid ABB/AAB). Pada pisang yang banyak mengandung genom B cenderung menghasilkan fenol yang lebih tinggi dibandingkan pisang yang tidak mengandung genom B atau sedikit mengandung genom B. Gen A yang dikandung pada pisang yang bergenom AAB atau ABB diduga berperan mengurangi atau menghambat keluarnya senyawa fenol.

Penggunaan zat pengatur tumbuh pada media tumbuh kultur pisang tampaknya harus disesuaikan dengan spesifikasi aksesori pisang terutama berdasarkan susunan genom. Dalam penelitian ini induksi tunas dilakukan dengan penambahan 5 mg/l BAP dalam media kultur ternyata lebih mendukung pertumbuhan dan perkembangan tunas pada aksesori pisang yang lebih banyak mengandung genom A pada ploidy. Pada aksesori pisang yang mengandung lebih banyak genom B pada ploidy membutuhkan penambahan BAP dengan konsentrasi tinggi. Hal ini terlihat dari hasil kultur pisang Ambon Kuning yang bergenom AAA mempunyai tingkat multiplikasi tunas lebih tinggi dari pisang Api Hijau atau Api Merah yang bergenom AAB atau dari pisang Kepok Kuning yang bergenom ABB.

Aksesori pisang yang sudah mengalami inisiasi tunas, dipindahkan ke media multiplikasi tunas untuk memperoleh tingkat multiplikasi tunas yang tinggi. Dimana tunas yang dihasilkan akan digunakan untuk penyediaan sumber eksplan dalam percobaan penyimpanan *in vitro* (konservasi *in vitro*). Aksesori yang belum mengalami inisiasi tunas akan dioptimasi sistem regenerasinya dengan melakukan

modifikasi media tumbuhnya yaitu menggunakan sitokinin dengan jenis dan konsentrasi yang berbeda-beda. Beberapa aksesori memberikan respon *in vitro* yang cukup baik yang ditandai dengan inisiasi tunas *in vitro* antara lain pada: pisang

Morosebo, Api Hijau, Telunjuk, Rotan, Gendruwo, Romo, dan Manalagi. Beberapa aksesori di antaranya bahkan sudah mengalami multiplikasi tunas antara lain: pisang Emas, Hutan, Kepok Kuning, Ambon Kuning, dan Raja Sereh (Gambar 4).



Gambar 4. Hasil pengamatan biakan beberapa aksesori plasma nutfah pisang 1) Ambon Kuning-multiplikasi tunas, 2) Lampung-inisiasi tunas, 3) Uli-sterilisasi, 4) Mas-inisiasi tunas, 5) Mas-multiplikasi tunas, dan 6) Telunjuk-inisiasi tunas

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari kegiatan eksplorasi dan pertukaran plasma nutfah telah berhasil dikoleksi sebanyak 30 aksesori plasma nutfah pisang dari daerah Kalimantan Timur, Banjarmasin (Kalimantan Selatan), Kebun Koleksi di Cibinong (Bogor), Yogyakarta, Rembang, Purworejo dan Subang, 20 aksesori di antaranya telah berhasil dikoleksi secara *in vitro*. Tingkat ploidi yang diperoleh dari aksesori plasma nutfah pisang adalah diploid ($2n=2x=22$) dan triploid ($2n=3x=33$). Dendogram hubungan kekerabatan dari sepuluh aksesori plasma nutfah pisang yang diamati (pisang Rotan, Telunjuk, Emas, Hutan, Lampung, Barangan, Tanduk, Api Merah, Api Hijau, dan Morosebo) berdasarkan ciri vegetatif dan generatif terbagi menjadi empat kelompok pada tingkat kemiripan 88.75%.

Aksesori pisang yang mengandung genom A (diploid AA atau triploid AAA) memiliki pertumbuhan yang lebih cepat dan jumlah tunas yang dihasilkan lebih banyak karena menghasilkan senyawa fenol lebih sedikit. Penambahan 5 mg/l BAP dalam media kultur ternyata lebih mendukung bertumbuhan dan perkembangan tunas pada aksesori pisang yang lebih banyak mengandung genom A pada ploidinya. Kultur pisang Ambon Kuning (AAA) mempunyai tingkat multiplikasi tunas lebih tinggi dari pisang Api Hijau atau Api Merah yang bergenom AAB atau dari pisang Kepok Kuning yang bergenom ABB.

Saran

Untuk mendapatkan biakan *in vitro* tanaman pisang dengan tingkat multiplikasi yang tinggi perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan zat pengatur tumbuh yang lain atau kombinasi antara sitokinin dan auksin.

Perlu dilakukan analisa dengan menggunakan isoenzym dan marka molekuler untuk dapat memastikan hubungan kekerabatan antar aksesori plasma nutfah pisang yang lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Beck, S.L., R.W. Dunlop, and A. Fossey. 2002. **Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild)**. Botanical Journal of the Linnean Society 144(2): 177-181.
- Darlington, C.D. and A.P Wylie. 1955. **Chromosome Atlas of Flowering Plants**. George Allen & Unwin LTD. London.
- Darnaedi, D. 1990. **Training Teknik Sitologi Angkatan I. Herbarium Bogoriensis**. Balitbang Botani. Puslitbang Biologi LIPI: 1-10.
- Fahn, A. 1991. **Anatomi Tumbuhan**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, P.T. Suzuki., R.C. Lewondin, and W.M. Gelbert. 1996. **An Introduction to Genetic Analysis. Ed 6th**. W. H. Freeman and company. New York.
- Hamill, S.D., M.K. Smith, and W.A. Dodd. 1992. **In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids**. Aust. J. Bot. 40: 887-896.
- Horak, J. 1972. **Ploidy chimeras in plants regenerated from the tissue cultures of *Brassica oleracea* L.** Biologia Plantarum 14(6): 423-426.
- IBPGR. 1984. **Revised Banana Descriptors (*Musa spp.*)**. International Board of Plant Genetic Resources (IBPGR). Rome. Italy.
- Keng, H. 1969. **Orders and Families of Malayan Seed Plants**. Singapore University Press. Singapore.
- Lozykoska, K.S. 2003. **Determination of the ploidy level in chamomile (*Chamomilla recutia* (L.) Rausch.) stains rich in α -bisabolol**. J. Appl. Gent. 44(2): 151-155.
- Pallardy, S.G. and T.T. Kozlowski. 1979. **Frequency and length of stomata of 21 Populus clones**. Can. J. Bot. 57(22): 2519-2523.
- Przywara, L., K.K. Pandey, and P.M. Sanders. 1988. **Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa***. New Zealand Journal of Botany 26: 179-182.
- Sass, J.E. 1951. **Botanical Microtechnique. Ed. Ke-2**. The Iowa State Collage Press. Iowa.
- Simmonds, N.W. 1959. **Bananas**. Longmans. London.
- Sutrian, Y. 1996. **Pengantar Anatomi Tumbuh-Tumbuhan tentang Sel dan Jaringan**. Rineka Cipta. Bandung.
- Teare, I.D., C.J. Peterson, and A.G. Law. 1971. **Size and frequency of leaf stomata in cultivars of *Triticum aestivum* and other Triticum spesies**. Crop. Sci 11: 496-498.
- Vandenhout, H., R. Ortiz., D. Vuylsteke., R. Swennen, and K.V. Bai. 1995. **Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids**. Euphytica 83: 117-122.
- Willmer, C.M. 1983. **Stomata**. Longman Inc., New York.