

KKP3T, Tahun II

**PEMANFAATAN RIZOBAKTERI
UNTUK
MENINGKATKAN MUTU PLANLET PISANG
DAN
TOLERANSI TERHADAP PENYAKIT LAYU FUSARIUM**



Dr Ir Darda Efendi, MSi

Dr Ir Widodo, MS

Dr Catur Hermanto

Dra. Jumjunidang, MSi.

Ir Kasutjaningati, MSi

PENDAHULUAN

Produksi belum mencukupi dan ekspor belum memuaskan :

◆ Produksi

- 1995: 3.805.431 ton
- 2000: 3.376.660 ton
- 2001: 4.300.433 ton
- 2005: 5.177.608 ton (BPS 2005).

◆ Ekspor

- 1999: 70.056.785 kg
- 2000: 2.102.654 kg
- 2002: 104.496 kg (Ditjen BPPHP, 2003)

PENDAHULUAN

Kendala peningkatan produksi:

- ◆ Lahan terinfeksi FOC: perkeb.Sinar Mas Group Halmahera dan NTF Industry Lampung (Poerwanto, 2003)
- ◆ FOC: *Fusarium oxysporum* F.sp *cubense*,
 - cendawan bersifat *soil born*,
 - mampu bertahan lama di dalam tanah (klamidospora sampai 30 th)
- ◆ **Ketersediaan Bibit !!!**

Kendala Bibit Anakan:

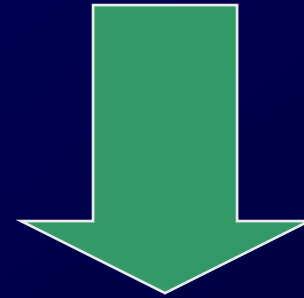
- ◆ Bibit bermutu terbatas
- ◆ Umur dan kondisi bibit tidak seragam
- ◆ Waktu pembibitan Lama
- ◆ Patogen terbawa bibit (Fusarium/FOC)



KULTUR JARINGAN

bibit anakan (sucker)
lebih tahan (sudah
berkorporasi dengan
MO bermanfaat)

KULTUR JARINGAN:
Kondisi bibit steril (*in vitro*) menjadi rentan
patogen di lapang,



Merger MO (rizobakteri)-planlet pisang sejak dini:

- ◆ Memproteksi perakaran bibit, dan diharap mampu menekan pathogen di lapangan.
- ◆ Mampu meningkatkan pertumbuhan dan produksi (meningkatkan aktivitas enzim mensintesis fitohormon, memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat)

Perbanyak konvensional/sukcer:

Kekurangan:

- Tidak tersedia bibit bermutu
- Jumlah terbatas
- Umur dan kondisi tidak seragam
- Lama waktu pembibitan
- Kendala utama, patogen terbawa bibit (FOC)

Kelebihan:

- Lebih tahan patogen (rizobakteri antagonis)

Isolasi
rizobakteri
antagonis FOC

**MERGER
KOKULTUR in
vitro RIZO +
EKSPLAN**

Perbanyak in vitro:

Kelebihan:

- *True to tipe*
- Jumlah banyak
- Umur dan kondisi seragam
- Waktu singkat
- Steril mikroorganisme

Kekurangan:

- Rentan patogen di lapangan

Inisiasi **eksplan**
(ZPT, genotipe,
tek. multiplikasi
dan regenerasi)
→ Planlet mutu
tinggi rentan
patogen

Keluaran : Teknologi perbanyak invitro

bibit pisang berkualitas dengan vigor yang kokoh, jumlah banyak dalam waktu singkat, *true to tipe*, mampu menekan patogen di lapangan serta mampu meningkatkan kuantitas dan kualitas produksi

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

- ◆ mampu meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan planlet tanaman:
 - kentang (Frommel *et al.* 1999)
 - anggur (Barka *et al.* 2002);
 - padi (Samiyapan 2003),
- ◆ planlet yang terbakterisasi tersebut tahan terhadap patogen (Frommel *et al.*, 1999; Barka *et al.*, 2002).
- ◆ Populasi endofitik tersebut mampu establis dan tidak perlu reinokulasi (Frommel *et al.*, 1991 dan Barka *et al.*, 2002).

Mekanisme pengendalian agen biokontrol

- ◆ **Pengendalian secara langsung** umumnya terjadi melalui mekanisme antibiosis, kompetisi, parasitisme dan lisis (Zhang, 2004).
 - senyawa siderofor mengkelat Fe
 - hidrogen cianida (HCN)
 - mensekresikan enzim ekstraseluler (kitinase, protease, selulase) yang dapat melisis atau mendegradasi dinding sel patogen

- ◆ **meningkatkan aktivitas enzim** yang mampu mensintesis hormon tumbuh, memfiksasi nitrogen atau melarutkan fosfat (Wei *et al* 1991; Thakuria *et al* 2004).
- ◆ **Mensintesis IAA:**
 - *Serratia spp* (Maunuksela, 2004).
 - *Bacillus spp* (Thakuria et al., 2004),
 - *P. fluorescens* (Thakuria et al., 2004),
- ◆ **Mensintesis giberellin**
 - *Bacillus spp* (Joo et al 2004)
 - *P. fluorescens* (Ping dan Boland 2004)
- ◆ **Mensintesis sitokinin**
 - *Bacillus spp* (Timmusk 2003).
 - *P. fluorescens* (Salamone & Nelson 2004).

Mekanisme Agen Biokontrol

Kolonisasi Rizo-agent dengan jaringan pisang
→ Eksudat tanaman (asam amino/asam organik)

Rizo meningkatkan pertumbuhan
→ Pitolhormon pada kuljar – tergantung ratio hormon/ZPT
→ Meningkatkan serapan hara (Phosfat dan N)

Rizo penghambatan patogen
→ Kompetisi besi (siderofor)
→ Antibiotik
→ Toksin
→ Enzim (peroxidase, LOX, PAL) – ISR
(β -1,3 glukonase, chitinase) – SAR

Konsistensi dan inkoorporisasi Rizo-agent
→ Mampu establis
→ Kerapatan (densitas) Rizo
→ Mampu kompetisi
→ ISR

Rizo potensi berkooperasi dengan bibit unggul kultur jaringan

T ar get BIBIT UNG GUL



Keluaran yang diharapkan:

- ◆ Teknologi perbanyakkan *in vitro* (merger kokultur rizobakteri-eksplan):
 - dihasilkan bibit pisang berkualitas dengan vigor yang kokoh, jumlah banyak dalam waktu singkat, *true to type*,
 - mampu menekan pathogen di lapangan
 - serta mampu meningkatkan kuantitas dan kualitas produksi buah



TUJUAN PENELITIAN

1. Mempelajari pengaruh eksudat eksplan pisang terhadap pertumbuhan dan perkembangbiakan koloni rizobakteri
2. Mempelajari kemampuan rizobakteri meningkatkan pertumbuhan dan mendukung perkembangan planlet *in vitro* dan bibit *in vivo*

TUJUAN PENELITIAN

3. Mempelajari kemampuan rizobakteri menekan serangan penyakit layu Fusarium (*FOC*)
4. Mempelajari dinamika populasi rizobakteri pada planlet, serta mengamati kemampuan rizobakteri untuk tetap konsisten dan establish menstimulasi pertumbuhan dan menekan kejadian penyakit setelah subkultur

HIPOTESIS

- ◆ Jaringan eksplan pisang mengeluarkan eksudat dan dimanfaatkan rizobakteri untuk tumbuh dan berkembangbiak (mengkolonisasi)
- ◆ Rizobakteri mampu memacu pertumbuhan planlet (*in vitro*), bibit aklimatisasi (*in vivo*)
- ◆ Rizobakteri mampu menekan serangan penyakit layu Fusarium
- ◆ Rizobakteri mampu konsisten dan mampu berkorporasi positif dalam jaringan tanaman pisang dalam memacu pertumbuhan dan menekan serangan penyakit layu Fusarium

TAHAPAN PENELITIAN (3 Thn)

1. Pengaruh eksudat eksplan terhadap pertumbuhan dan kemampuan berkolonisasi rizobakteri
2. Uji kemampuan rizobakteri meningkatkan pertumbuhan dan mendukung perkembangan planlet pisang secara *in vitro* dan *in vivo* dengan modifikasi lingkungan tumbuh
3. Karakter fisiologis dan efektifitas rizobakteri sebagai agen antagonis patogen pisang
4. Konsistensi dan inkorporasi rizobakteri sebagai agen biokontrol terhadap respon fisiologis tanaman pisang

Persiapan Plantlet
(Tanduk, Rajabulu)

- Bonggol
- Eksplant MS
(Establishment)
- SK1

Persiapan Inokulum rizo-agent
non pathogen

- organisme hidup
- PGPR
- Hidup pada Jaringan tanaman



Percobaan I: Pengaruh
eksudat eksplan



Percobaan II: Karakter
Fisiologis dan Efektifitas
rizo-agent pemacu
pertumbuhan



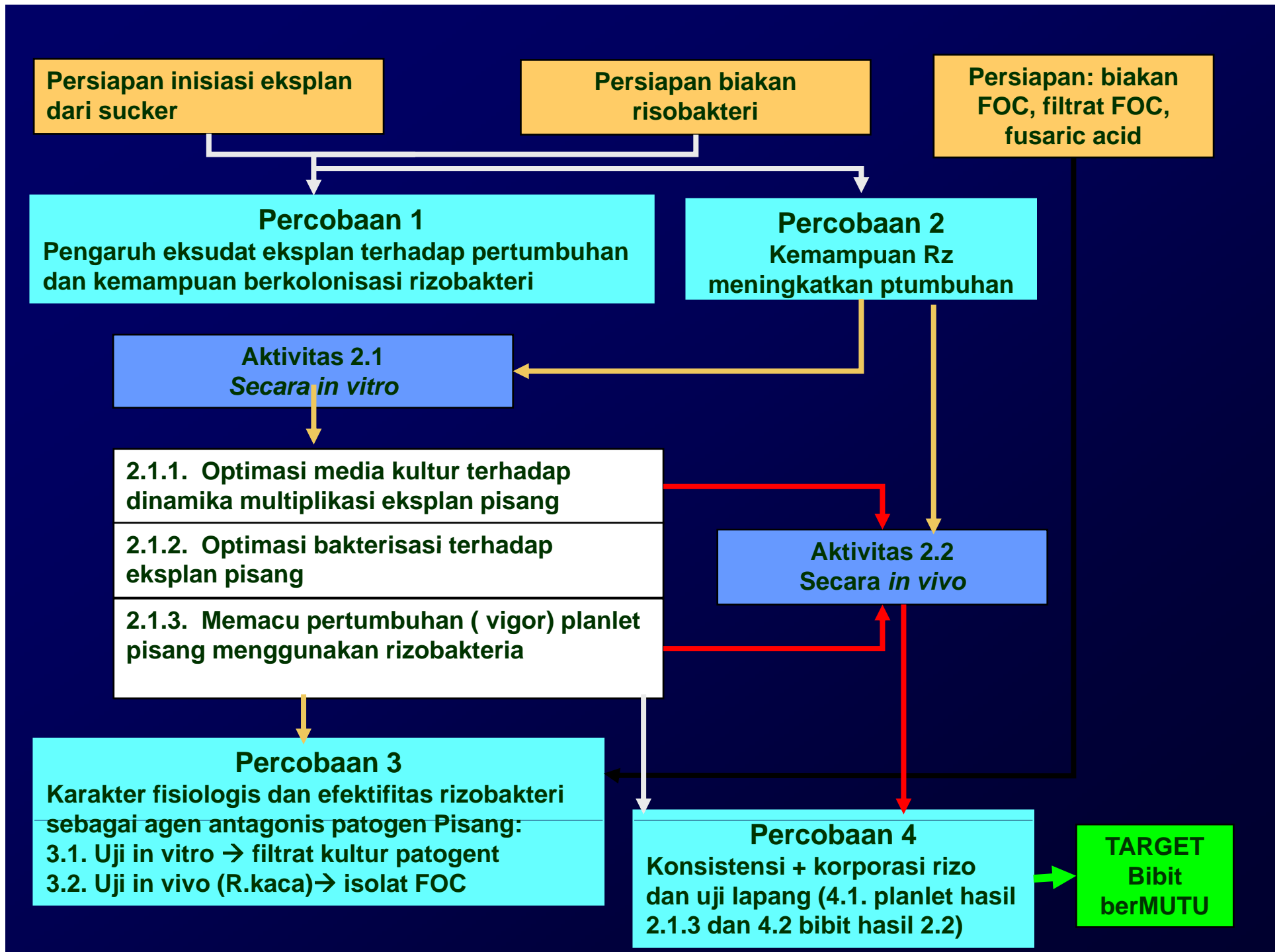
Percobaan IV:
Konsistensi dan
inkorporasi rizo-agents



Percobaan III: Karakter
dan efektifitas
rizobakteri sebagai agen
antagonis



Persiapan isolat FCC, kultur
filtrat, asam fusarat



1. Percobaan 1. Pengaruh eksudat eksplan terhadap pertumbuhan dan kemampuan berkolonisasi rizobakteri
2. Percobaan 2. Uji kemampuan Rizobakteri meningkatkan pertumbuhan dan mendukung perkembangan planlet pisang secara in vitro dan in vivo dengan memodifikasi lingkungan tumbuh
 - 2.1. Pengaruh inokulum rizobakteri terhadap pertumbuhan dan perkembangan planlet pisang secara in vitro :
 - ◆ 2.1.1. Optimasi media kultur terhadap dinamika multiplikasi eksplan
 - ◆ 2.1.2. Optimasi bakterisasi terhadap eksplan pisang
 - ◆ 2.1.3. Memacu pertumbuhan dan perkembangan vigor planlet pisang menggunakan rizobakteri
 - 2.2. Pengaruh inokulum rizobakteri terhadap pertumbuhan dan perkembangan bibit/tanaman pisang secara in vivo

3. Percobaan 3. Karakter fisiologis dan efektifitas rizobakteri sebagai agen antagonis pathogen pisang

3.1. Uji in vitro ketahanan planlet terhadap FOC dengan menggunakan filtrat kultur pathogen/asam fusarat x

3.2. Uji in vivo ketahanan bibit/tanaman pisang terhadap FOC dengan menggunakan isolate FOC

4. Percobaan 4. Konsistensi dan inkorporasi rizobakteri sebagai agen biokontrol terhadap respon fisiologis tanaman pisang

Percobaan 1:

Pengaruh eksudat eksplan terhadap pertumbuhan dan kemampuan berkolonisasi rizobakteri

Faktor 1: Jenis pisang;

- ◆Musa AAB-tanduk. = T
- ◆Musa AAB-raja bulu = R

Faktor 2: Isolat rizobakteri mutan:

- *P. fluorescens* ES-32mrif,
- *B. substilis* SB-3 mrif,

Eksplan *Stadia* berakar

Percobaan 2:

2.1. Pengaruh inokulum rizobakteri terhadap pertumbuhan dan perkembangan planlet pisang secara *in vitro*

2.1.1 Optimasi media kultur terhadap dinamika multiplikasi eksplan pisang

2.1.2 Optimasi bakterisasi terhadap eksplan pisang

2.1.3 Memacu pertumbuhan dan perkembangan vigor planlet pisang menggunakan rizobakteria

2.2. Pengaruh inokulum rizobakteri terhadap pertumbuhan dan perkembangan bibit/tanaman pisang secara *in vivo*

Aktivitas 2.1.1 Optimasi media kultur terhadap dinamika multiplikasi eksplan pisang

◆ *ZPT*

- BA(2 mg/l)+IAA (3 mg/l) : **M3**
- BA (2 mg/l)+TDZ (0.4 μ M)+IAA (3 mg/l): **M4**

◆ *Parameter pengamatan:* sampai 3 kali subkultur:

- jumlah tunas
- vigor tunas (tinggi tunas, kesempurnaan tunas, warna, ketegaran tunas, nodul)
- jumlah akar

Aktivitas 2.1.2. Optimasi bakterisasi terhadap eksplan pisang

◆ **Stadia dan Pelukaan:**

- eksplan berakar (Ea), dilukai pisau (P) : EaP
- eksplan berakar (Ea), ditusuk jarum (J): EaJ

- **media padat**

◆ *Parameter pengamatan:* setiap subkultur

- Kemampuan tumbuh eksplan (% hidup)
- jumlah tunas,
- vigor tunas (tinggi tunas, kesempurnaan tunas, warna, ketegaran tunas, nodul).

Aktivitas 2.1.3.

Memacu pertumbuhan dan perkembangan planlet pisang menggunakan rizobakteria

Rancangan Percobaan:

- ◆ Rizobakteri uji:
 - *Pseudomonas fluorescens* ES-32,
 - *Bacillus substilis* SB-3,
 - Campuran keduanya

- ◆ Media dan Bakterisasi
 - bakterisasi pada MS0: B
 - tanpa bakterisasi pada MS0 : K
 - tanpa bakterisasi pada MS+ZPT : Z
 - bakterisasi pada MS+ZPT: BZ

Aktivitas 2.1.3.

Memacu pertumbuhan dan perkembangan planlet pisang menggunakan rizobakteria

Parameter pengamatan:

- ◆ Pengamatan dilakukan sampai subkultur ke-5).
 - Jumlah tunas,
 - tinggi tajuk,
 - berat kering tajuk,
 - jumlah akar,
 - panjang akar,
 - berat kering akar,
 - kualitas tunas (vigor).
- ◆ Kandungan lignin planlet, diamati pada akhir generasi ke 5.
- ◆ Anatomi jaringan batang semu dan akar planlet pada hasil pertumbuhan subkultur pertama dan terakhir (generasi ke 5) dengan menggunakan mikroskop elektron (EM) dan mikroskop cahaya (LM).

HASIL TAHUN I

Hasil untuk multiplikasi rajabulu (R) respon terhadap media baru

- Total tunas R tertinggi pd komposisi MB1 (4.48) dan MB2 (4.87), didukung oleh tingginya jumlah **tunas sedang** (2-3 cm).
- Tunas sedang terbanyak pada MB1 (2.96) dan MB2 (2.75).
- Tunas besar ditemui pada MB4 (2.05), tp tdk sempurna (+GA) penambahan GA pelepah memanjang, daun kecil tdk normal
- penurunan IAA pada MB memperbaiki vigor lebih baik (MB1, MB2),
- penurunan BA pengaruh tidak nyata terhadap perbaikan vigor tanamn



Pertumbuhan eksplan pisang raja bulu dan pisang tanduk, pelepah memanjang, daun kecil (tidak normal) dengan penambahan GA (MB4, MB5 dan MB6)





MB4

tunas
←
sedang

RAJABULU

Vigor eksplan rajabulu lebih baik dengan penurunan konsentrasi IAA = tunas sedang

(MB1, MB2, MB3 dan MB0)

Tabel 4.

interaksi MAx MB	MB1	MB2	MB3	MB4	MB5	MB6	MB0
	Total tunas						
MA3	A 12.50	CD 7.92	CD 7.09	E 4.67	E 4.15	CD 7.58	DE 5.88
MA4	A 14.63	A 13.39	AC 11.42	DE 5.33	DE 5.03	E 4.66	BC 8.47
Tunas sedang							
MA3	A 4.08	B 1.33	C 0.86	B 1.04	AB 2.00	C 0.92	B 1.38
MA4	B 1.68	B 1.37	AB 2.20	AB 2.36	B 1.31	C 0.53	B 1.92
Tunas besar							
MA3	C 0.00	C 0.00	B 0.62	AB 1.08	C 0.08	AB 1.17	A 1.50
MA4	C 0.00	C 0.00	C 0.11	C 0.08	C 0.00	C 0.00	C 0.13

Rata-rata total tunas, jumlah tunas sedang dan tunas besar pisang tanduk terhadap pengaruh interaksi perlakuan media inisiasi dan media multiplikasi (MAx MB)



Tabel 5. Rata-rata jumlah tunas kecil pisang tanduk pada perlakuan media inisiasi (MA) dan media multiplikasi (MB)

MEDIA	Tunas kecil
MA3	B 5.00
MA4	A 7.68
MB0	C 5.10
MB1	A 11.17
MB2	AB 10.08
MB3	B 8.00
MB4	D 2.75
MB5	CD 3.24
MB6	C 4.50



MB1

**tunas
kecil**



MBO

PISANG TANDUK

Hasil multiplikasi tanduk (T) respon terhadap media baru

tanduk lebih responsif terhadap sitokinin, makin tinggi sitokinin tunas makin banyak, tapi tunas yang dihasilkan makin tidak sempurna.

interaksi MAxMB terhadap total tunas tertinggi berturut-turut MA4MB1, MA4MB2, didominasi t. kecil (kurang 2 cm) tertinggi (MB1)

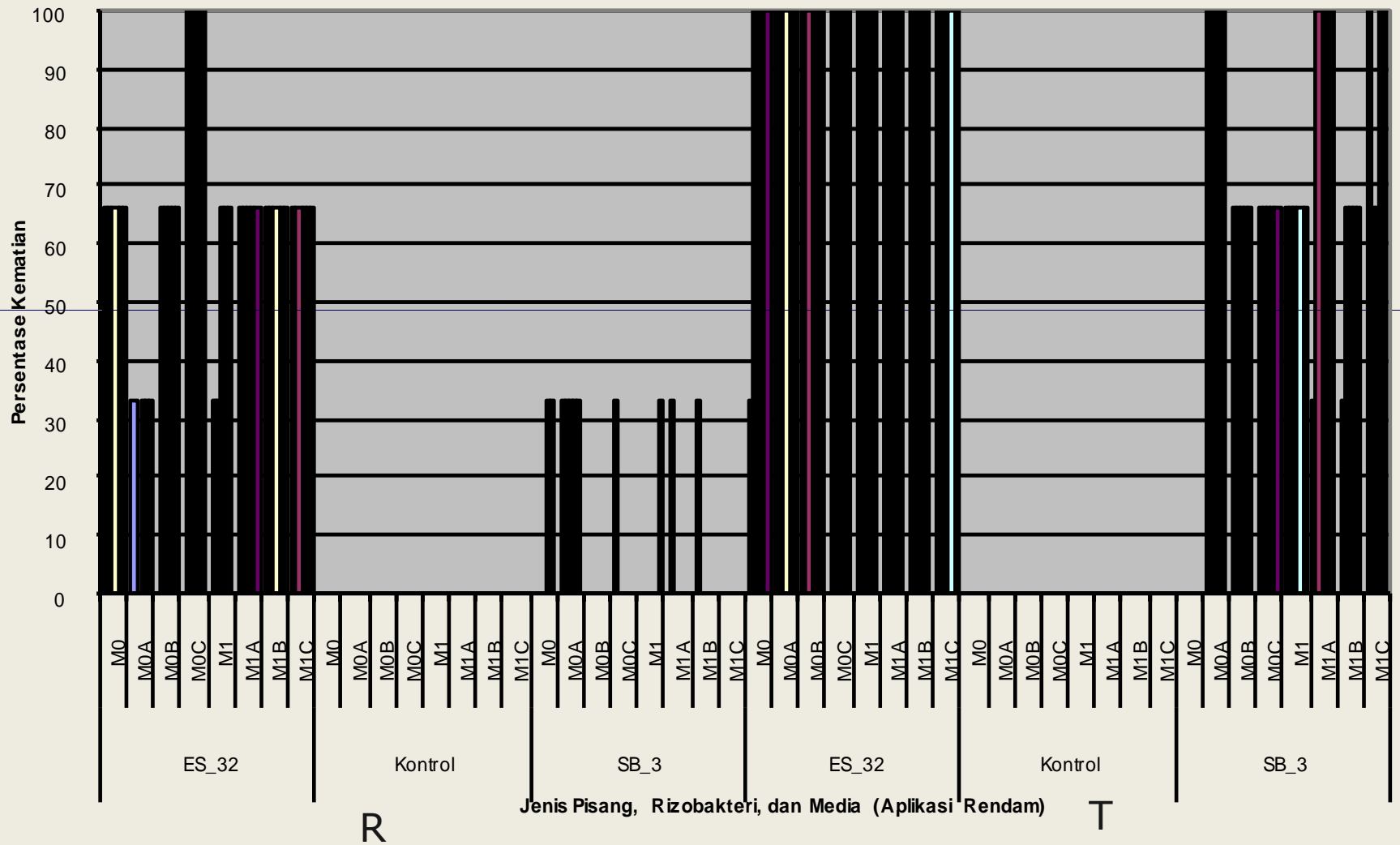
tunas besar tertinggi diperoleh (MB0) atau pada media dengan komposisi sitokinin rendah (MB3). (MB0) tunas tanduk yang abnormal mampu tumbuh sempurna (tunas besar, ukuran lebih 3 cm dan vigor tunas sempurna

Keluaran media baru:

- multiplikasi R tertinggi MB1 dan MB2 , menghasilkan gol tunas sedang
- multiplikasi T tertinggi MB1 dan MB2, menghasilkan gol tunas kecil,
- tunas T dan MB0 menunjukkan perbaikan performa tunas tunas besar.
- berarti media multiplikasi pisang rajabulu dan pisang tanduk terbaik MB1 atau MB2

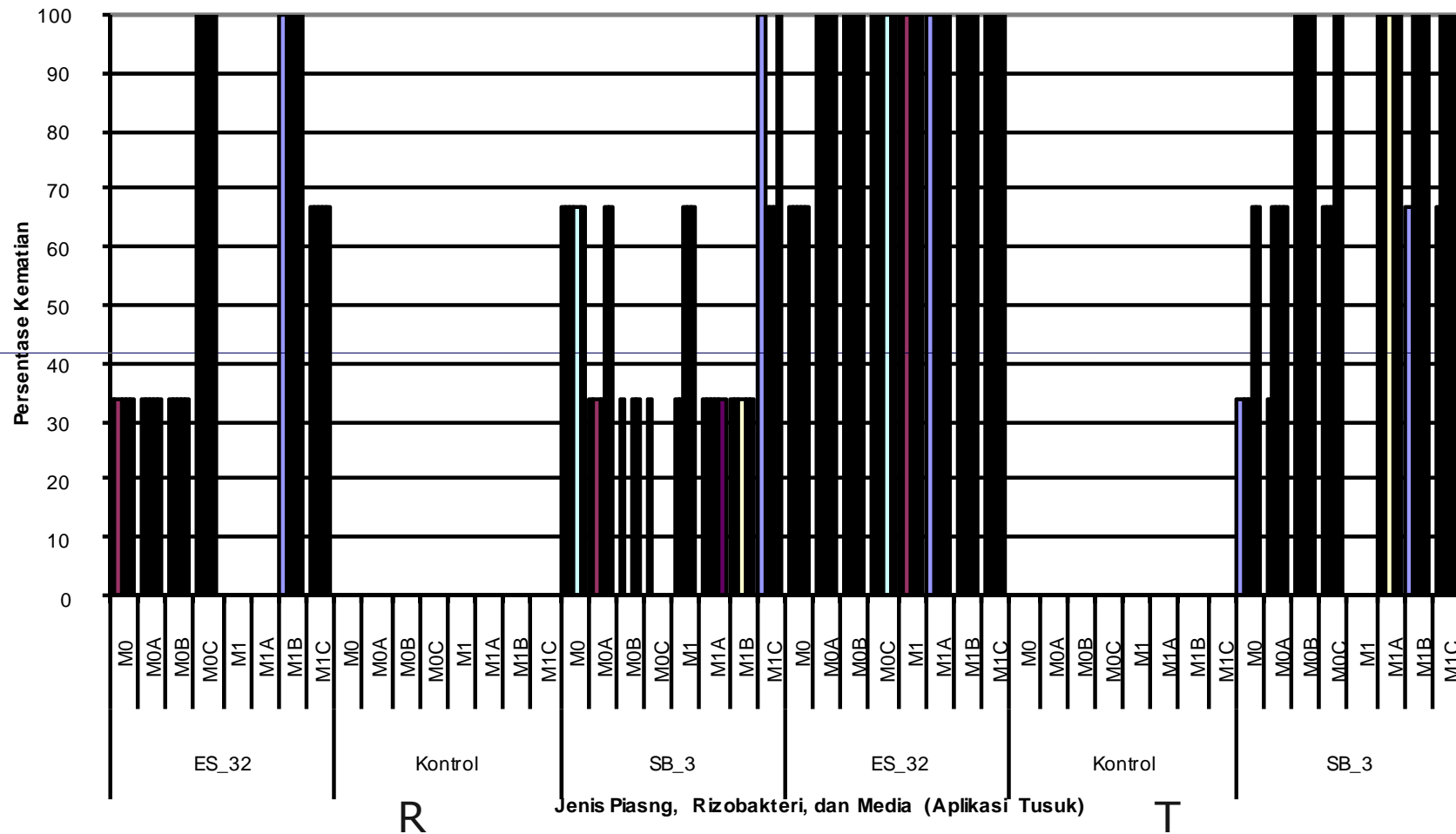
Hasil Tahun 2

% Kematian Eksplan paa TSB (10%, 20 % dan 30%)



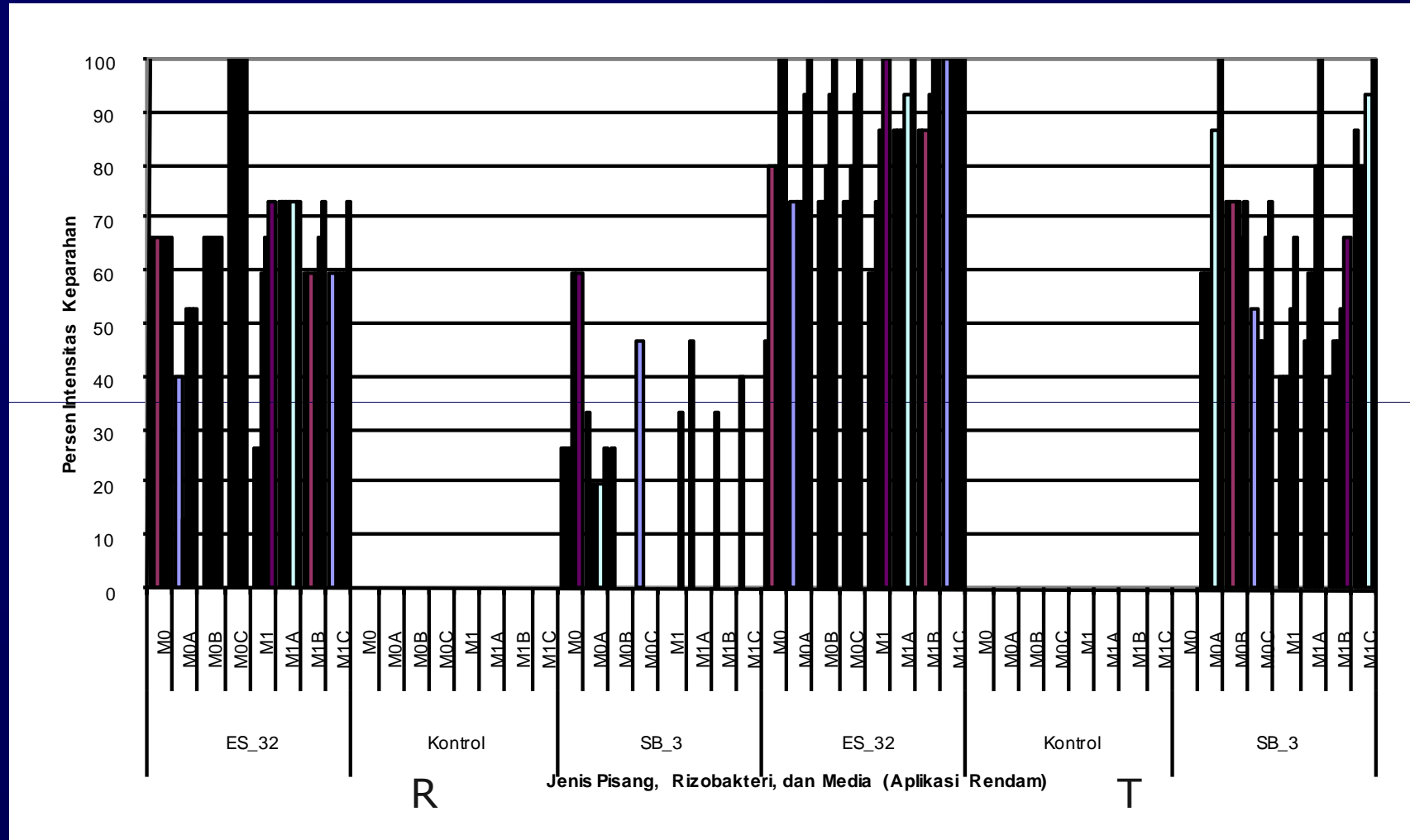
Hari pengamatan: 3-7-10-14-21

TSB (10%, 20 % dan 30%)



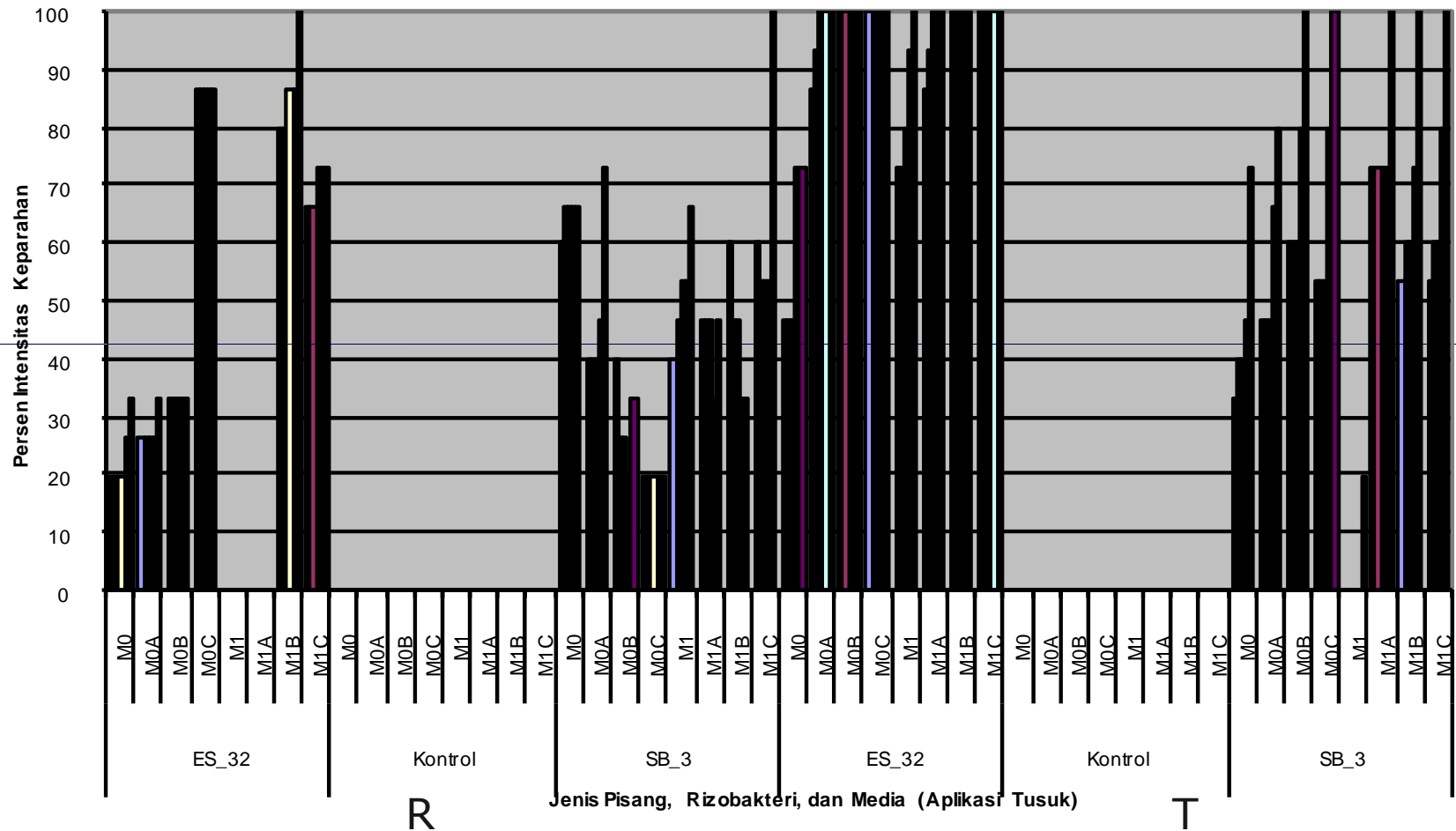
Hari pengamatan: 3-7-10-14-21

% Keparahan Pertumbuhan Bakteri TSB (10%, 20 % dan 30%)



Hari pengamatan: 3-7-10-14-21

TSB (10%, 20 % dan 30%)



Hari pengamatan: 3-7-10-14-21

Optimasi Aplikasi Bakteri

- ◆ Kegiatan menggunakan 2 jenis eksplan pisang (tanduk dan raja) dan dua bakteri (*Pseudomonas fluorescens* ES-32 dan *Bacillus substilis* SB-3).
- ◆ Metode aplikasi rizobakteri :
 - Eksplan ditusuk ujung pisau, pada stadia eksplan dewasa (TSDP),
 - Eksplan ditusuk pisau pada eksplan stadia multiplikasi (TSMP),
 - Eksplan dibelah dengan pisau pada stadia eksplan dewasa (BSDP),
 - Eksplan dibelah dengan pisau, pada stadia eksplan multiplikasi (BSMP), dan
 - aplikasi pada stadia eksplan siap aklim dengan 100 ul suspensi bakteri (SSAK).

Hasil

- ◆ **Persentase Kematian** Eksplan Pisang menggunakan berbagai metode aplikasi bakteri setelah 3 MSA

PIS	MED	ES_32				SB_3		
		BSDP	BSMP	TSDP	TSMP	SSAK	TSDP	TSMP
R	M0	0	40	0	100	0	0	100
	M1	0	40	0	100	0	0	100
	M1D	0	30	0	100	0	0	100
	M1E	0	50	0	100	0	0	100
	M1F	0	40	0	100	0	0	100
T	M0	100	30	0	100	0	0	100
	M1	60	30	0	100	0	0	100
	M1D	50	60	0	100	0	0	100
	M1E	10	40	0	100	0	0	100
	M1F	40	20	0	100	0	0	100

- ◆ aplikasi bakteri pada stadia "dewasa" merupakan stadia yang paling memungkinkan untuk aplikasi rizobakteri

MP= multiplikasi;

DP=dewasa;

AK= aklimatisasi

2.1.2 Optimasi bakterisasi terhadap eksplan pisang

Konsentrasi TSB Rendah

- ◆ menurunkan [TSB], pada media MS (MS_0) dan MS_1
 - media D: 1%,
 - media E: 0,5%
 - media F: 0,25% TSB)
- ◆ eksplan pisang tanduk stadia dewasa
- ◆ yang diaplikasi dengan ditusuk jarum yang telah dicelup pada 2 rizo bakteri mutan (*Pseudomonas fluorescens* ES-32 dan *Bacillus substilis* SB-3).

Persentase kematian tanaman pisang tanduk pada berbagai media kultur dengan penambahan TSB setelah aplikasi bakteri (2 minggu dan 4 minggu) dan 2 minggu setelah subkultur

MED	BAKT								
	Air (Kontrol)			ES_32			SB_3		
	2			4			2		
	2 MSA	4 MSA	MSSK	2 MSA	4 MSA	2 MSSK	2 MSA	MSA	MSSK
M0	0	0	0	0	0	0	50	50	60
M1	0	0	0	0	0	0	40	40	60
M1D	0	0	0	0	0	20	10	30	50
M1E	0	0	0	0	0	40	50	50	50
M1F	0	0	0	0	30	50	30	40	60

media D, E dan F (1%, 0,5% dan 0,25% TSB) pada media MS (MS0 dan MS1)

Hasil

- ◆ menunjukkan bahwa masih terjadi pertumbuhan bakteri yang hebat pada media walaupun sudah dilakukan penurunan tambahan TSB di media kultur
- ◆ terjadi persen kematian eksplan yang besar terutama pada aplikasi *Bacillus substilis* SB-3.

- ◆ Penambahan TSB sedikit atau banyak tetap memacu pertumbuhan bakteri dan mengganggu kestabilan multiplikasi tunas eksplan, khususnya saat tanaman melakukan pemulihan dari kondisi pelukaan saat pembelahan eksplan.

Kokultur tanpa TSB

- ◆ Untuk membuktikan konsistensi kemampuan kokultur rizobakteri dengan planlet pisang, dilakukan percobaan kembali pada media M_1 tanpa TSB.
- ◆ Hasil menunjukkan pada kondisi tanaman *in vitro*, bila pertumbuhan koloni bakteri hebat tanaman biasanya tidak bertahan dan mati.
- ◆ Pada tanaman yang hidup dan mampu bermultiplikasi dilakukan subkultur pertama dan yang berhasil bertahan dilanjutkan ke subkultur ke dua pada media yang sama.
- ◆ Pertumbuhan eksplan yang eksis terlihat bertunas tetapi kecil-kecil, koloni bakteri umumnya tidak nampak dipermukaan media.

- ◆ Tetapi bila akar eksplan dipotong-potong dan dilakukan plating di media NA, maka disekitar potongan akar tersebut setelah 24 jam memperlihatkan adanya pertumbuhan koloni bakteri, sedang pada tanaman kontrol tidak ada.



Gambar 7. Uji plating akar tanaman yang diaplikasi bakteri, potongan akar tanaman kontrol tidak ada pertumbuhan koloni bakteri (atas), potongan akar tanaman perlakuan nampak ada pertumbuhan koloni (bawah)

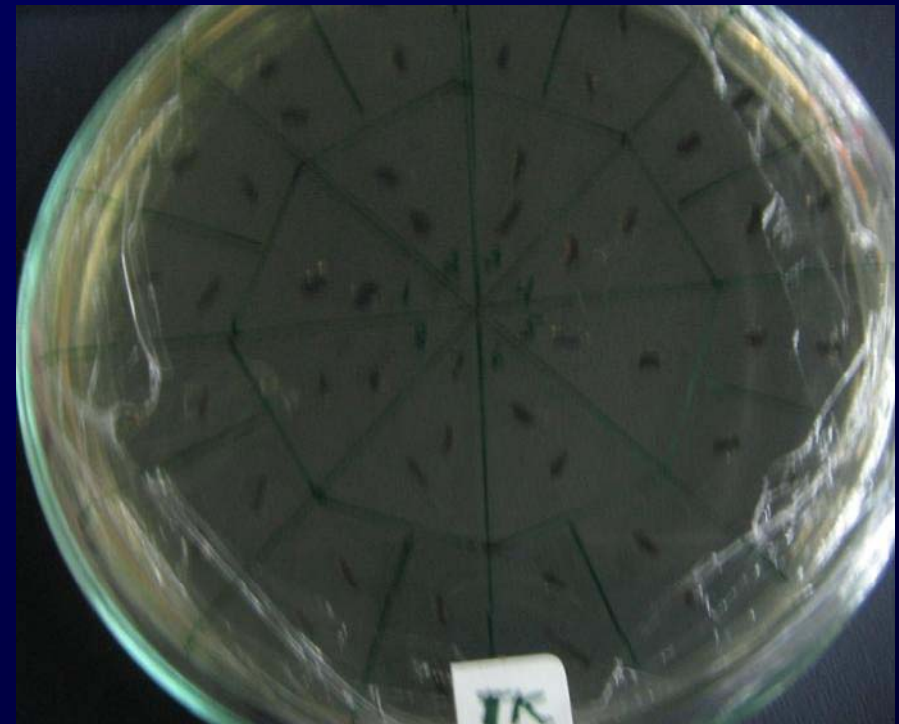
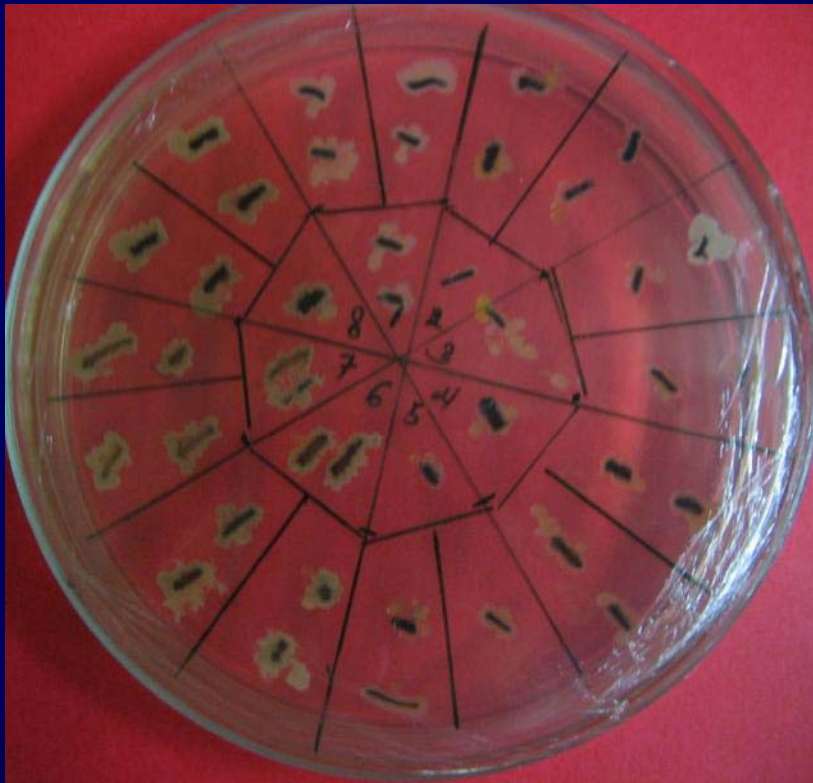
- ◆ Selanjutnya eksplan yang berhasil tumbuh di subkultur ke dua dilanjutkan pada subkultur ke_3 masuk ke dalam media MS0, tanaman yang hidup dipersiapkan untuk aklimatisasi. Vigor tanaman yang kecil-kecil di subkultur_1 dan subkultur_2, setelah disubkultur_3 vigor menjadi tinggi (5-10 cm),
- ◆ rencana selanjutnya eksplan akan dicoba untuk di aklimatisasi dan akarnya diambil sebagian untuk di cek keberadaan bakterinya dengan dilakukan plating di media NA (belum dilakukan).

Pertumbuhan hasil subkultur pertama, kedua pada media M_1 dan pertumbuhan hasil subkultur ke_3 pada media M_0 siap aklim



- ◆ selanjutnya eksplan dicoba untuk di aklimatisasi dan akarnya diambil sebagian untuk di cek keberadaan bakterinya dengan dilakukan plating di media NA

Contoh hasil plating akar tanaman pada pertumbuhan sub kultur pertama dan subkultur ke dua



Aplikasi Bakteri Mutan Rifampisin dan Plating Akar

- ◆ Dengan tujuan lebih memastikan keberadaan bakteri antagonis bisa eksis bersama-sama tanaman, mengikuti pola multiplikasi, bahkan sampai aklimatisasi dan ke lapangan.
- ◆ Maka dilakukan percobaan dengan menggunakan bakteri antagonis mutan rifampisin.
- ◆ Aplikasi rizobakteri dilakukan pada tanaman stadia dewasa pada media M_1, M_1D (+1% TSB), M_1E (+0,5% TSB) dan M_1F (+0,25% TSB).

- ◆ Seperti percobaan sebelumnya pada pertumbuhan bakteri yang masih bisa ditolerir oleh tanaman, maka eksplan mampu tumbuh dan berkembang dan sebaliknya.
- ◆ Pada persiapan media dengan tambahan TSB mempunyai kendala teknis yang sulit (selalu terkontaminasi sebelum digunakan dengan bakteri bukan target) yaitu media tidak dapat tersedia tepat waktu, pertumbuhan eksplan yang hidup menjadi terlambat untuk dipindah (disubkultur), yang seharusnya 2-4 minggu sudah di subkultur sampai 12 minggu baru bisa dilaksanakan subkultur.

- ◆ Kondisi eksplan saat tersebut akar sudah banyak, media sudah berwarna hitam, sehingga tidak nampak apabila ada kontaminan cendawan. Setelah 3-4 hari hasil subkultur semua permukaan eksplan ditutupi oleh pertumbuhan cendawan kontaminan dari lingkungan (*aspergillus*/*rhizopus*), dan tidak ada yang selamat.
- ◆ Demikian pula pada sebagian besar plating akar, pada hari ke dua masih tampak pertumbuhan bakteri tetapi pada hari ketiga keatas permukaan ditutupi oleh cendawan kontaminan. Walau demikian masih bisa dipastikan pada setiap plating akar ada pertumbuhan bakteri mutan.



Eksplan sebelum disubkultur berumur 12 mst (atas), dan kondisi setelah disubkultur, permukaan eksplan tertutup cendawan kontaminan (bawah)



(atas) plating akar di kotak no 5 dan 6 adalah pertumbuhan kolonisasi mutan bakteri, di kotak 4 dan 7 adalah pertumbuhan koloni bakteri ditumpangi cendawan kontaminan



(bawah) plating akar dikotak 6, 7 dan 8 adalah pertumbuhan koloni mutan bakteri, di kotan 1-5 adalah pertumbuhan koloni bakteri ditumpangi cendawan kontaminan.

2.2.4. Pengaruh Rizobakteri dalam Memacu Pertumbuhan Tunas

- ◆ Pengamatan hasil uji kontras “pengaruh rizobakteri dalam memacu pertumbuhan tunas” menunjukkan bahwa rata-rata jumlah tunas (rajabulu dan tanduk) karena interaksi bakteri dan media pada eksplan kontrol (tanpa bakteri), jumlah tunas pada media M_1 (media ZPT tanpa TSB) lebih besar dibanding jumlah tunas pada media M_0 (MS0)
- ◆ Berarti pada media tanpa ZPT tanpa TSB bakteri dapat meningkatkan jumlah tunas (kondisi pertumbuhan bakteri terkontrol),
- ◆ pada media mengandung ZPT dan tanpa TSB pengaruh bakteri tidak nampak,
- ◆ pada media ZPT+ TSB +bakteri perkembangan bakteri yang hebat menghambat penyerapan nutrisi akibatnya tidak ada pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

- ◆ Sedang rata-rata jumlah akar berbanding terbalik dengan pertumbuhan dan perkembangan tunas (Gambar 8 dan Gambar 9).
- ◆ Pada tanaman yang berhasil hidup, dan berhasil melampaui sampai subkultur ke 3 dan apabila potongan-potongan akarnya dilakukan uji plating di media NA menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri.
- ◆ Dengan demikian dapat dipastikan bakteri dapat mengikuti multiplikasi tunas pada tanaman yang eksis secara *invitro*.



Gambar 8. Kokultur pisang tanduk dengan rizobakteri SB_3 setelah 4 MSA, pada media M_1 (+ ZPT) eksplan bertunas (kiri) dibandingkan M_0 (MS0) (kanan). Pertumbuhan akar berbanding terbalik dengan pertumbuhan tunas



Gambar 9. Kokultur pisang rajabulu dengan rizobakteri ES_32 setelah 6 MSA, pada media M_1 (+ ZPT) eksplan bertunas (kiri) dibandingkan M_0 (MS0) (kanan). Pertumbuhan akar berbanding terbalik dengan pertumbuhan tunas

Tabel 8. Rata-rata jumlah tunas dan jumlah akar pisang rajabulu terhadap pengaruh interaksi rizobakteri, macam media kultur (B*M), 6 MSA

B*M	M0	M1	MA	MB	MC	M1A	M1B	M1C
Tunas								
Kontrol	0.00 F	4.33 AC	0.00 F	0.00 F	0.00 F	3.0 AD	5.50 A	5.00 AB
ES_32	0.63 EF	2.6 BD	0.16 F	0.00 F	0.00 F	1.33 DF	0.00 F	0.00F
SB_3	2.17 CE	2.29 CE	0.00 F	0.00 F	0.00 F	1.50 DF	1.50 DF	0.00 F
Akar								
Kontrol	3.33 BC	2.67 C	4.00 BC	2.25 C	4.17 BC	2.00 C	3.25 BC	3.50 BC
ES_32	7.13 BC	3.00 C	8.00 BC	5.00 BC		2.33 C	2.00 C	2.00 C
SB_3	10.50 B	3.13 C	22.50 A	1.50 C	1.50 C	3.00 C	2.00 C	

V. KESIMPULAN

Tahun I

- ◆ Eksudat yang dikeluarkan oleh eksplan pisang dapat mempengaruhi pergerakan (khemotaksis) dan merangsang pertumbuhan bakteri seperti pada perlakuan sukrosa dan glisin.
- ◆ Untuk pisang tanduk dan rajbulu Media yang terdiri dari MS + BA 2 mg/l + TDZ 0,4 μ M + IAA 3mg/l menghasilkan tunas yang lebih banyak dibanding media yang mengandung MS + BA 2mg/l + IAA 3 mg/l. Tunas yang dihasilkan kecil-kecil, roset dan tidak sempurna.

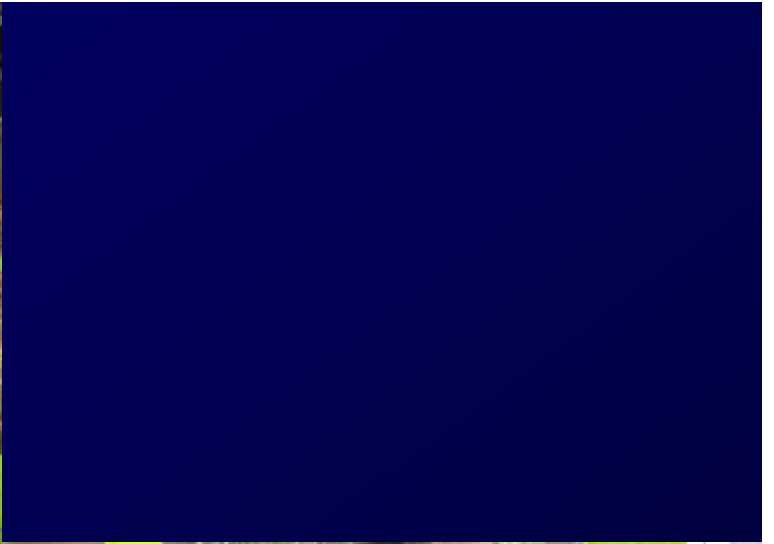
- ◆ Pertumbuhan planlet pisang raja bulu menjadi lebih baik **dengan penurunan konsentrasi IAA tanpa menggunakan TDZ** (Media MS + BA 2 mg/l + IAA 0,5 mg/l; Media MS + BA 2 mg/l + IAA 0,25 mg/l; atau Media MS + BA 2 mg/l + IAA 0,01 mg/l). Pertumbuhan eksplan pisang tanduk pada media ini juga lebih baik tapi ukuran tunas yang dihasilkan masih tetap kecil.
- ◆ Pertumbuhan pisang rajabulu dan tanduk **tidak normal** (pelepah daun memanjang dan daun mengecil) pada media yang mengandung giberelin (Media MS + BA 2 mg/l + IAA 0,5 mg/l + **GA 3 mg/l**; Media MS + BA 2 mg/l + IAA 0,25 mg/l + GA 3 mg/l; Media MS + BA 2 mg/l + IAA 0,01 mg/l + GA 3 mg/l)

Tahun II

- ◆ Pada kondisi merger plantlet pisang-bakteri, pertumbuhan tunas eksplan pisang raja bulu dan tanduk pada media yang menggunakan **ZPT lebih baik** bila dibanding pada media MS_0 (eksplan cenderung tumbuh banyak akar, dan pertumbuhan jumlah tunas terhambat).
- ◆ Pada media M0, perlakuan bakteri (terutama SB-3, bacillus) dapat meningkatkan jumlah tunas.

- ◆ Pertumbuhan bakteri antagonis yang terlalu hebat, terutama pada media yang dilengkapi dengan 10-30% TSB, dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan.
- ◆ Penambahan TSB serendah 0.25% tetap memacu pertumbuhan bakteri yang dapat mengganggu kestabilan kultur pisang, mengganggu penyerapan nutrisi dan ZPT, terjadi malnutrisi, zpt menjadi tidak efektif, menghambat multiplikasi tunas, tanaman stres, terberat tanaman mati (20-100%)

- ◆ Media multiplikasi untuk keperluan kokultur rajabulu dan tanduk adalah **MB1** (Media MS +BA 2 mg/l +IAA 0,5 mg/l) **tanpa TSB**
- ◆ Stadia eksplan dewasa (stadia persiapan aklimatisasi) merupakan stadia yang paling efektif dan efisien untuk kokultur (merger) rizobakteri dan eksplan, media kokultur cukup MB0
- ◆ Meskipun kokultur stadia multiplikasi tidak efisien dan tidak ekonomis, pada percobaan ini terbukti rizobakteri bisa diaplikasikan, persisten dalam jaringan akar tanaman, mengikuti pola multiplikasi tunas sampai subkultur ke3



Terima Kasih



Kesimpulan

- ◆ Dari percobaan mutan bakteri dapat disimpulkan bahwa aplikasi bakteri secara in vitro bisa dilakukan, dan **optimum pada stadia dewasa** pada saat tanaman siap aklim,
- ◆ Tidak perlu tambahan TSB pada media
- ◆ Aplikasi rawan dilakukan pada stadia multiplikasi, walau bisa dilakukan tetapi tidak ekonomis karena persen kematian lebih besar dari pada keberhasilan

Kendala teknis pelaksanaan percobaan *in vitro*:

- ◆ Besarnya pengaruh faktor luar terutama kontaminasi mikroorganisme dari lingkungan
- ◆ Menyatukan dua fenomena yang berbeda (kultur jaringan menghendaki kondisi aseptik/aksenik yang pertumbuhan 100% bergantung pada nutrisi dan ZPT media, harus digabungkan dengan mikroorganisme walaupun sifatnya bukan patogen)

Rencana percobaan selanjutnya:

- ◆ Mengulang percobaan mutan bakteri
- ◆ Mempersiapkan percobaan in vivo

Terima Kasih

