

## Pengeluaran benih pisang melalui teknologi kultur tisu

(Production of banana planting materials via tissue culture technology)

Mohd Shaib Jaafar, Abd Halim Mat Zain, Nabila Arshad, Jaliyah Abu Bakar dan Halimah Hashim

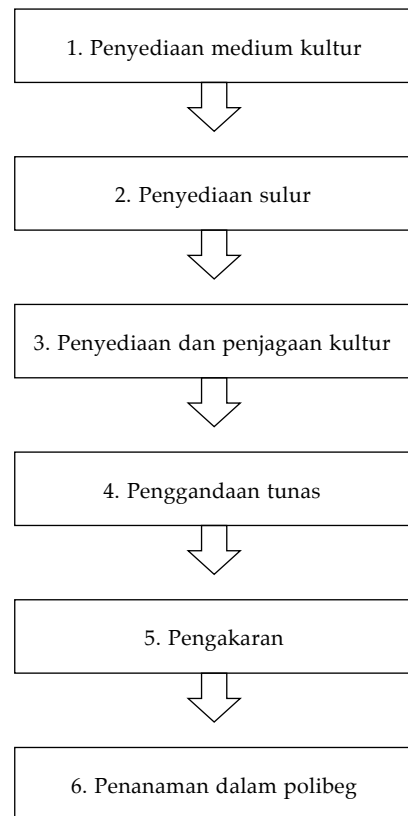
### Pengenalan

Pisang merupakan salah satu daripada buah-buahan penting bagi rakyat Malaysia dan juga bagi penduduk dunia. Ia dimakan segar dan dijadikan ramuan dalam pemprosesan produk makanan seperti kerepek. Keperluan benih pisang sentiasa meningkat, lebih-lebih lagi dalam tempoh beberapa tahun kebelakangan ini disebabkan ancaman penyakit, khususnya Moko dan layu Fusarium. Penyakit Moko telah menyebabkan banyak kawasan penanaman terjejas, mengakibatkan kurangnya bekalan buah di pasaran dan meningkatnya harga komoditi berkenaan. Faktor penyakit ini juga menjadikan benih konvensional, iaitu sulur kurang popular kerana dikhuatiri membawa risiko penyakit. Industri pisang kini lebih meyakini benih yang dihasilkan melalui teknologi kultur tisu.

Pembiakan tanaman pisang menggunakan kaedah kultur tisu lebih baik kerana selain bebas penyakit, benih yang dihasilkan lebih terjamin dari segi ketulenan varieti, pokok tumbuh seragam dan mengeluarkan hasil 2 – 3 bulan lebih awal serta hasil buah lazimnya 25 – 30% lebih tinggi berbanding dengan pokok yang ditanam menggunakan sulur. Pembiakan juga lebih cepat dan boleh dilakukan secara besar-besaran berbanding dengan kaedah biasa. Kaedah kultur tisu melibatkan penggunaan kemudahan makmal khusus yang menyediakan ruang kerja yang steril atau bebas kuman, di samping kawasan semeian untuk pembesaran anak pokok pisang sebelum dijual untuk penanaman.

### Proses pengeluaran

Proses pengeluaran benih pisang menggunakan kaedah kultur tisu ditunjukkan dengan ringkas dalam *Carta alir 1*.



*Carta alir 1. Proses pengeluaran benih pisang secara kultur tisu*

### Medium kultur

Medium membekalkan segala keperluan zat makanan, hormon dan bahan-bahan lain yang mempengaruhi tumbesaran tisu. Medium yang digunakan ialah medium Murashige & Skoog (1962), ringkasnya digelar medium MS (*Jadual 1*). Komponen penting dalam medium MS ini ialah sumber garam tak organik yang terdiri daripada makronutrien dan mikronutrien, vitamin, gula sebagai sumber karbon dan tenaga serta air. Bagi kebanyakan jenis pisang, termasuk pisang Mas, pisang Berangan dan pisang Nangka, tambahan hormon BAP (benzyl amino-purina) diperlukan untuk memperoleh kadar pembiakan yang tinggi. Bagaimanapun, bagi pisang Tanduk atau Helang, hormon ini tidak diperlukan.

Lazimnya medium disediakan dengan mencampurkan larutan stok makronutrien, mikronutrien, ferum dan vitamin yang disediakan terlebih dahulu (*Jadual 2*) dan bahan-bahan lain pada kadar seperti dalam *Jadual 3* dan *4* mengikut peringkat kultur.

### Menyediakan larutan stok

Empat botol larutan stok untuk komponen makronutrien, mikronutrien, ferum dan vitamin disediakan sebanyak 500 ml

Jadual 1. Formulasi medium pembiakan pisang

Komponen	Amaun
1. Makronutrien	
Ammonium nitrat – $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.65 g
Kalium nitrat – $\text{KNO}_3$	1.90 g
Kalsium klorida – $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$	0.44 g
Magnesium sulfat – $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.37 g
Kalium dihidrogen fosfat – $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.17 g
2. Mikronutrien	
Asid borik – $\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2 mg
Mangan sulfat – $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9 mg
Zink sulfat – $\text{ZnSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.6 mg
Kalium iodida – KI	0.83 mg
Natrium molibdat – $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg
Kuprum sulfat – $\text{CuSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg
Kobalt klorida – $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg
3. Ferum	
Ferum sulfat – $\text{FeSO}_4$	27.85 mg
Natrium-EDTA – NaEDTA	37.25 mg
4. Vitamin	
Thiamina HCl	0.1 mg
Piridoksin HCl	0.5 mg
Asid nikotinic	0.5 mg
Glisin	2.0 mg
5. Mio-inositol	0.1 g
6. Sukrosa	30 g
7. Air kelapa muda	150 ml (15% isi padu)

Jadual 2. Penyediaan larutan stok (500 ml)

Komponen	Amaun
1. Makronutrien	
Ammonium nitrat - $\text{NH}_4\text{NO}_3$	82.50 g
Kalium nitrat - $\text{KNO}_3$	95.00 g
Kalsium klorida - $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$	22.00 g
Magnesium sulfat - $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18.50 g
Kalium dihidrogen fosfat - $\text{KH}_2\text{PO}_4$	8.50 g
2. Mikronutrien	
Asid borik - $\text{H}_3\text{BO}_3$	0.310 g
Mangan sulfat - $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	0.845 g
Zink sulfat - $\text{ZnSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.430 g
Kalium iodida - KI	0.0415 g
Natrium molibdat - $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0125 g
Kuprum sulfat - $\text{CuSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.25 mg
Kobalt klorida - $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.25 mg
3. Ferum	
$\text{FeSO}_4$	1.3925 g
NaEDTA	1.8625 g
4. Vitamin	
Thiamina HCl	0.005 g
Piridoksin HCl	0.025 g
Asid nikotinik	0.025 g
Glisin	0.100 g

Jadual 3. Kandungan medium peringkat permulaan/penggandaan

Komponen	Amaun
Larutan stok makronutrien	10 ml/liter
Larutan stok mikronutrien	10 ml/liter
Larutan stok ferum	10 ml/liter
Larutan stok vitamin	10 ml/liter
Gelrite	2 g/liter
Sukrosa	30 g/liter
BAP (6 - Benzilaminopurina)	5 mg/liter
Air kelapa	150 ml

Jadual 4. Kandungan medium peringkat pengakaran

Komponen	Amaun
Larutan stok makronutrien	10 ml/liter
Larutan stok mikronutrien	10 ml/liter
Larutan stok ferum	10 ml/liter
Larutan stok vitamin	10 ml/liter
Gelrite (jika perlu)	2 g/liter
Sukrosa	30 g/liter
Arang teraktif	3 g/liter
Air kelapa	150 ml

setiap satu pada kepekatan 100x dengan menimbang komponen-komponen seperti dalam *Jadual 2* dan melarutkannya dengan sedikit air suling satu per satu. Larutan ini kemudiannya digenapkan menjadi 500 ml dengan menambah air suling. Larutan stok makronutrien, mikronutrien dan ferum boleh disimpan pada suhu bilik sementara larutan stok vitamin disimpan di dalam peti sejuk atau lebih baik di dalam penyejuk beku ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Secara umumnya, larutan stok disimpan untuk selama 3 – 4 bulan sahaja.

#### ***Menyediakan medium***

Komponen untuk menyediakan 1 liter medium untuk kultur peringkat permulaan dan penggandaan atau untuk proses pengakaran ditunjukkan seperti dalam *Jadual 3* dan *4*. Selain larutan stok, bahan perlu ditimbang atau disukat dan dimasukkan ke dalam bekas besar yang bersesuaian yang mengandungi 500 ml air suling. Komponen dimasukkan satu persatu dan larutan digenapkan menjadi 1 liter. Nilai pH bancuhan ditetapkan pada tahap 5.7 – 5.8 dengan menggunakan larutan 0.1N atau 0.01N asid hidroklorik (HCl) atau natrium hidroksida (NaOH). Larutan dituang ke dalam bekas kultur pada kadar 20% jumlah isi padu bekas. Bekas ditutup dengan tudung plastik atau kerajang aluminium dan diautoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan  $1.06\text{ kg/cm}^2$  selama 15 – 20 minit. Bagi medium pengakaran, bekas kultur perlu digoncang perlahan-lahan sebelum medium menyejuk agar arang tidak mendap ke bawah. Bekas yang mengandungi medium ini disimpan di tempat yang bersih sebelum digunakan.

#### ***Penyediaan sulur***

Pembiakan pisang bermula daripada penghasilan sulur daripada pokok induk yang baik. Induk yang baik bebas daripada penyakit, berprestasi baik serta berupaya mengeluarkan hasil yang tinggi. Sulur yang digunakan ialah sulur pedang yang berketinggian 60 – 90 cm, berbentuk tiga segi, lebar di pangkal dan mempunyai daun tirus di hujung (*Gambar 1*). Sulur sebegini mempunyai bekalan makanan yang banyak dan mempunyai keupayaan hidup dan kecergasan yang tinggi selepas dikultur. Sementara itu sulur air yang batangnya kurus serta mempunyai daun yang telah terbuka tidak disyorkan kerana jenis ini mempunyai kadar tumbesaran yang rendah.



*Gambar 1. Sulur pedang daripada pokok induk yang baik*

Sulur pisang perlu dikorek dengan cermat untuk mengelak kecederaan fizikal pada bahagian

umbi. Ini bertujuan mengelak jangkitan kuman yang ada di persekitaran. Umbi khususnya di tengah bahagian kolar (di mana umbi dan pangkal pelepah bertemu membentuk garisan), mengandungi tunas hujung atau *apical meristem* yang menjadi sumber pembiakan tunas dalam proses kultur tisu pisang. Sulur pedang dibersihkan dan disimpan beberapa hari dalam keadaan kering sebelum digunakan.

Untuk mendapatkan tunas hujung yang dijadikan *eksplan* atau bahan pemula proses pembiakan, sulur dirapi di bahagian kolar bermula dari bahagian luar sehingga memperoleh keratan setinggi 10 cm, iaitu 5 cm di bawah dan 5 cm di atas garis kolar dan yang bergaris pusat anggaran 5 cm. Keratan sulur pisang ini kemudiannya dibasuh dengan serbuk pencuci dan dibilas dengan air paip yang mengalir untuk menghilangkan kesan sabun sebelum dibawa ke dalam ruang steril di dalam makmal untuk kerja pensterilan dan inokulasi.

#### **Penyediaan dan penjagaan kultur**

Proses pemencilan tunas, pensterilan dan inokulasi tisu ke dalam medium dilakukan dalam keadaan persekitaran yang steril di dalam kabinet aliran udara *laminar*.

#### ***Pemencilan tunas***

Tunas hujung yang berada di tengah bahagian keratan sulur dipencilkan dengan memotong sulur 1 cm di atas dan 1 cm di bawah garisan kolar. Pelepah daun dibuang lapis demi lapis sehingga keratan sulur bersaiz 1 cm garis pusat.

#### ***Pensterilan dan inokulasi***

Keratan sulur direndam di dalam larutan bahan pembasmi kuman seperti larutan 10% peluntur Clorox selama 20 minit, kemudian dibilas dengan air suling yang steril sebanyak tiga kali. Keratan sulur dirapikan (*trim*) dengan memotong bahagian atas dan bawah untuk membuang tisu yang rosak akibat terkena bahan pembasmi kuman tersebut. Keratan sulur yang mengandungi tunas apeks atau tunas hujung yang telah dirapikan ini dibelah dua. Ia dinamakan eksplan atau tisu pemula bagi kultur. Eksplan diinokulasi ke dalam medium tumbesaran sebelum bekas kultur ditutup dan kultur dilabel dengan maklumat penting seperti jenis pisang, tarikh inokulasi dan nama pekerja yang menyediakannya (*Gambar 2*).

#### ***Inkubasi***

Bekas yang mengandungi medium dan tisu tanaman, digelar kultur, diletakkan di atas rak di dalam bilik tumbesaran (*Gambar 3*). Keadaan di dalam bilik tumbesaran dikawal suhunya pada 25 – 27 °C dan diberi pencahayaan lampu kalimantang selama 12 jam sehari dari pukul 7.00 pagi – 7.00 malam. Kebersihan bilik tumbesaran dijaga dengan teliti untuk



Gambar 2. Eksplan dipindahkan ke medium untuk memulakan kitaran pembiakan kultur tisu



Gambar 3. Kultur diinkubasi di dalam bilik tumbesaran yang bersih



Gambar 4. Tunas dipindahkan ke medium baru untuk tumbesaran dan penggandaan

mengurangkan sumber pencemaran yang boleh menjejaskan kultur.

#### **Subkultur dan penggandaan bahan tunas**

Pengkulturan semula tisu (subkultur) dijalankan untuk menggantikan medium yang kehabisan zat makanan dan unsur-unsur lain yang diperlukan untuk tumbesaran tisu dan pembentukan organ. Bagaimanapun, sebelum subkultur dilakukan, kultur pisang diperiksa untuk menentukan sama ada ia hidup, mati atau tercemar oleh mikroorganisma. Kultur yang mati atau yang tercemar oleh mikroorganisma akan dibuang dan dinyahlumus menggunakan autoklaf dan dilakukan setiap 4 – 6 minggu.

Sementara kultur yang baik dibawa ke dalam kabinet aliran udara *laminar* untuk proses subkultur. Tisu dikeluarkan dari botol kultur menggunakan forsep dan diletakkan di atas pelapik yang steril. Eksplan ini kemudian dipotong menggunakan forsep dan skalpel untuk membuang tisu yang mati, dirapikan dan diletakkan di dalam medium yang baru. Ia kemudian diletakkan semula di dalam bilik tumbesaran untuk pembentukan dan penggandaan tunas (Gambar 4).

#### **Pengakaran**

Kultur yang telah menjalani enam subkultur mempunyai komposisi tunas kecil dan besar. Tunas yang kecil dirapikan dan disubkultur semula di dalam medium penggandaan untuk penggandaan seterusnya. Tunas-tunas yang mencapai ketinggian minimum 3 cm dan mempunyai sekurang-kurangnya 3 helai daun diasingkan dan

daun yang berwarna kuning, layu atau kering serta akar yang baru terbentuk dibuang. Tunas ini kemudiannya dimasukkan ke dalam medium pengakaran (Gambar 5).

### ***Penanaman di dalam polibeg***

Selepas 4 – 6 minggu di dalam medium pengakaran, anak pokok sedia untuk dipindahkan ke nurseri. Anak pokok pisang yang lengkap dikeluarkan daripada bekas kultur dengan berhati-hati, dibersihkan dan direndam selama 5 minit di dalam larutan racun kulat. Anak pokok kemudiannya dipindahkan ke dalam polibeg yang mengandungi *coco peat* sahaja atau campuran yang mengandungi tanah, pasir, *coco peat* dan baja organik, sebagai medium penanaman (Gambar 6). Pada 2 minggu pertama penanaman, anak pisang dilindungi dengan jaring hitam atau bahan-bahan lain seperti daun kelapa yang menapis 75 – 80% daripada sinaran matahari. Penyiraman dilakukan dua kali sehari. Selepas 2 minggu, teduhan dikurangkan secara beransur-ansur agar anak pokok dapat menyesuaikan diri dengan persekitaran yang normal. Pembajaan menggunakan baja butiran NPK Hijau (15:15:15) diberikan pada kadar 0.3 g pada minggu kedua dan 0.6 g pada minggu keempat. Kawalan serangga dan penyakit dilakukan secara pencegahan dan juga apabila perlu.

### **Kesimpulan**

Pembiakan benih pisang secara kultur tisu menjadi pilihan kerana dapat menghasilkan mutu benih yang tinggi dan bebas daripada penyakit. Pokok kultur tisu berbuah 2 – 3 bulan lebih awal dan 5 – 30% lebih tinggi berbanding dengan pokok yang ditanam menggunakan sulur biasa. Antara faktor terpenting dalam proses pengeluaran secara kultur tisu ini ialah kebersihan. Di samping itu, kemudahan makmal yang sesuai dan keupayaan mengendalikan bahan kimia juga penting. Untuk menghasilkan benih berkualiti, kawalan bermula daripada penjagaan pokok induk di ladang ortet, pengendalian bahan tanaman dan kultur di dalam makmal serta pengendalian anak pokok di nurseri.



*Gambar 5. Tunas yang cukup besar boleh dipindahkan untuk pengakaran*



*Gambar 6. Anak pokok anggaran umur 6 minggu yang telah dipindahkan ke dalam polibeg*

### **Bibliografi**

- Bairu, M.W., Stirk, W.A. dan Van Staden (2009). Factors contributing to *in vitro* shoot tip necrosis and their physiological interaction. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 98(3): 239 – 248
- Damasco, D.P. dan Barba, R.C. *In Vitro* culture of Saba bananas *Musa balbisiana* cv. Saba BBB. *Proc. Int. Agric. Res. Centers and Biotech.* m.s. 41 – 44
- Hamidah, G., Mohamed Senawi, M.T. dan Mohd Shaib, J. (1987). Pembiakan Pisang Mas Secara *in vitro*. *Teknologi buah-buahan* Jil. 3 m.s. 7 – 11. Serdang: MARDI
- Murashige, I. dan Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473 – 497

### **Ringkasan**

Teknologi kultur tisu telah dibangunkan dan diguna pakai di MARDI untuk pengeluaran benih pisang Berangan, Mas, Tanduk, Nangka dan lain-lain. Untuk menghasilkan benih berkualiti, kawalan kualiti dilaksanakan di sepanjang rangkaian proses pengeluaran. Pemilihan dan penjagaan pokok induk yang bermutu di ladang ortet, penggunaan teknik *in vitro* dan formulasi bahan nutrien dan hormon yang sesuai semasa proses pengkulturan serta penggunaan medium penanaman dan kawalan persekitaran serta kawalan serangga dan penyakit di nurseri menyumbang secara langsung kepada kejayaan proses pengeluaran.

### **Summary**

Tissue culture technology has been developed and applied in the propagation of various banana cultivars, including Berangan, Mas, Tanduk, Nangka and others at MARDI. For the production of high quality planting materials, quality control is practised in all processes along the production chain. The success of the production activity depends on factors such as proper selection and maintenance of mother plants in the ortet gardens, the application of appropriate *in vitro* techniques and use of proper nutrient and hormone formulations during culture, the use of suitable growing media for plantlet establishment and the proper management of pests and diseases.

### **Pengarang**

Mohd Shaib Jaafar

Unit Pengeluaran Bahan Tanaman, Biji Benih dan Baka Ternakan

Ibu Pejabat MARDI Serdang, Peti Surat 12301, 50774 Kuala Lumpur

E-mel: shaib@mardi.gov.my

Abd Halim Mat Zain, Nabila Arshad, Jaliyah Abu Bakar dan Halimah Hashim

Unit Pengeluaran Bahan Tanaman, Biji Benih dan Baka Ternakan

Stesen MARDI Jalan Kebun, Peti Surat 186, 41720 Klang Selangor