

Induksi Poliploid Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) dengan Pemberian Kolkisin

Polyploid induction of *Allium ascalonicum* L. by colchicine

SUMINAH, SUTARNO, AHMAD DWI SETYAWAN
Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta Surakarta 57126.

Diterima: 5 Desember 2001, Disetujui 31 Januari 2002

ABSTRACT

The low production rate of shallot (*Allium ascalonicum* L.) in Indonesia could be caused by rarely excellent cultivars. Colchicine was one of the mutation agents frequently used in plant breeding in order to get polyploidy of cultivars. The aim of this research was to find out the differentiation of morphometric evidences and ploidy of shallot chromosomes induced by colchicines 1%. Preparation was made by squash method and stained by acetocarmine. The results indicated that the amount, length and shape of chromosomes altered by the application of the agent. The polyploids produced could be grouped into tetraploids, pentaploids, hexaploids, octaploids, and nonaploids.

© 2002 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key Words: chromosome, polyploids, *Allium ascalonicum* L., colchicines.

PENDAHULUAN

Bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) merupakan sayuran umbi yang multiguna, dapat digunakan sebagai bumbu masakan, sayuran, penyedap masakan, di samping sebagai obat tradisional karena efek antiseptik senyawa anilin dan alisin yang dikandungnya (Rukmana, 1994). Bahan aktif minyak atsiri bawang merah terdiri dari sikloaliin, metilaliin, kaemferol, kuersetin, dan floroglusin (Muhlizah dan Hening-S, 2000).

Bawang merah termasuk dalam divisi Spermatophyta, sub divisi Angiospermae, kelas Monocotyledonae, ordo Liliales, familia Liliaceae, genus *Allium*, spesies *Allium ascalonicum* L., sinonim *Allium cepa* var. *ascalonicum*. Tanaman ini dapat tumbuh dan berproduksi dengan baik di dataran rendah sampai dataran tinggi, hingga ketinggian \pm 1.100 m dpl. Namun produksi terbaik dihasilkan di dataran rendah (0-500 m dpl), bersuhu 25-32°C, pH tanah antara 5,5-6,5,

dan mendapat sinar matahari \pm 70% (Rukmana, 1994; Wibowo, 1991).

Rata-rata produksi bawang merah nasional saat ini masih rendah. Padahal iklim, musim dan lahan di Indonesia memungkinkan budidaya tanaman ini secara besar-besaran, khususnya di pulau Jawa. Rendahnya daya produksi bawang merah antara lain disebabkan karena sedikitnya kultivar-kultivar unggul dan proses pengolahan pertanian yang kurang baik (Rukmana, 1994; Wibowo, 1991). Kultivar-kultivar unggul dapat diperoleh melalui pemuliaan tanaman, diantaranya mutasi dan prosedur transgenik. Pemuliaan dengan mutasi dapat dilakukan dengan kolkisin pada jaringan meristem (Suryo, 1995).

Kolkisin ($C_{22}H_{25}O_6N$) merupakan suatu alkaloid berwarna putih yang diperoleh dari umbi tanaman *Colchichum autumnale* L. (Familia Liliaceae). Senyawa ini dapat menghalangi terbentuknya benang-benang spindel pada pembelahan sel sehingga menyebabkan terbentuknya individu poliploidi (Eigsti dan Dustin, 1957; Suryo, 1995).

Apabila kolkisin digunakan pada konsentrasi yang tepat maka jumlah kromosom akan meningkat, sehingga tanaman bersifat poliploid. Tanaman yang bersifat poliploid umumnya memiliki ukuran morfologi lebih besar dibandingkan tanaman diploid. Dengan demikian kualitas tanaman yang diberi perlakuan diharapkan lebih baik dibandingkan tanaman diploid. Umumnya kolkisin akan bekerja efektif pada konsentrasi 0,01-1% untuk jangka waktu 6-72 jam, namun setiap jenis tanaman memiliki respon yang berbeda-beda (Eigsti dan Dustin, 1957; Suryo, 1995).

Setiap spesies memiliki jumlah kromosom yang khas. Sebagian besar organisme berderajat tinggi memiliki jumlah kromosom yang bersifat diploid. Variasi jumlah set kromosom (ploidi) sering ditemukan di alam. Pada keadaan normal materi genetik setiap makhluk hidup stabil (tidak berubah-ubah), akan tetapi karena adanya pengaruh luar atau dari dalam sel itu sendiri dapat terjadi perubahan. Perubahan materi genetik karena pengaruh dari dalam sel merupakan ciri benda hidup yang membedakannya dengan benda mati, yakni dapat melakukan mutasi dan menjaga keanekaragaman hayati. Perubahan materi genetik karena pengaruh dari luar sel dapat disebabkan oleh bahan kimia maupun radiasi (Pai, 1992).

Mutasi dapat dibedakan atas mutasi sitologis yakni perubahan bentuk, ukuran ataupun jumlah kromosom, serta mutasi gen yang secara sitologis tidak tampak namun mempengaruhi penampakan fenotip. Mutasi terakhir ini dapat dideteksi dengan teknik molekuler. Perubahan jumlah kromosom dapat dibedakan atas euploidi dan aneuploidi. Pada kondisi euploidi jumlah kromosom merupakan kelipatan dari kromosom dasarnya. Variasi euploidi yang dapat terjadi adalah: monoploid (haploid; $1n$), diploid ($2n$) dan poliploid yang terdiri dari: triploid ($3n$), tetraploid ($4n$), pentaploid ($5n$), heksaploid ($6n$), septaploid ($7n$), oktaploid ($8n$), dan nonaploid ($9n$). Variasi aneuploid meliputi delesi, duplikasi, inversi dan translokasi. Delesi atau defisiensi adalah hilangnya satu bagian kromosom. Duplikasi adalah penambahan kromosom. Inversi adalah penyisipan kembali gen-gen secara terbalik. Translokasi adalah pindahnya suatu bagian kromosom ke kromosom lain yang bukan homolognya (Crowder, 1986).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan sifat-sifat morfometri dan ploidi

kromosom *A. ascalonicum* akibat pemberian kolkisin 1%.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Obyek penelitian ini adalah ujung akar *Allium ascalonicum* L yang diperoleh dari kawasan Kota Surakarta dan sekitarnya. Bahan kimia yang digunakan meliputi: etanol, kolkisin 0,2% dan 1%, asam asetat 45%, asam klorida 1N, asetokarmin 2%, gliserin, cat kuku, akuades, dan minyak emersi.

Alat

Alat yang digunakan meliputi: kotak penanaman, botol flakon, gelas benda, gelas penutup, kotak preparat, kertas aluminium foil, kertas label, kertas tissue, kapas, pinset, skalpel, kuas, jarum preparat, penggaris, oven, lemari es, mikrofotografi, dan mikroskop cahaya.

Cara kerja

Pemilihan bibit. Umbi yang telah tua dengan umur 60-90 hari pasca panen, disinari matahari sekitar empat hari untuk mematahkan dormansi.

Penanaman. Umbi diletakkan dalam kotak penanaman dengan dialasi kapas basah. Setiap hari air diganti untuk mencegah terbentuknya bakteri, jamur dan menjamin aerasi oksigen. Kecepatan pertumbuhan akar tergantung lamanya dormansi termasuk umur panen, lama penyimpanan, dan kesegaran bahan. Umbi yang akarnya telah tumbuh direndam dalam kolkisin 1% selama 3-4 hari sampai terbentuk pembesaran (Jw: *jendulan*) pada akar. Selanjutnya umbi dipindahkan kembali dalam media air selama 1 hari, agar sel-selnya mendapat kesempatan untuk tumbuh pada kondisi normal.

Pembelahan mitosis optimum. Setiap tumbuhan memiliki waktu optimum pembelahan mitosis yang khas. Begitu juga dengan *A. ascalonicum* yang memiliki waktu pembelahan mitosis optimum metafase antara pukul 08.00-09.00 WIB (Anggarwulan dkk., 1999).

Kemikalia. Kolkisin 1% (atau 0,2 %). Sebanyak 1 g (atau 0,2 g) kolkisin dilarutkan dengan 5 ml etanol, lalu ditambah 95 ml akuades dan diaduk hingga larut. Disimpan dalam botol tertutup, berwarna gelap, dalam lemari es bersuhu 5°C. **Asam asetat 45%.**

Asam asetat glasial 45 ml dan 55 ml akuades diaduk hingga larut lalu disimpan dalam botol tertutup pada suhu kamar. **Asam Klorida 1 N.** Asam klorida Pekat 1 bagian ditambah 11 bagian akuades digojog hingga larut dan disimpan dalam botol tertutup pada suhu kamar (Soesanti dan Setyawan, 2000).

Asetokarmin 2%. Sebanyak 45 ml asam asetat glasial dipanaskan perlahan-lahan hingga hampir mendidih (90° - 100° C) ditambahkan 0,5 g karmin sedikit demi sedikit lalu dididihkan selama \pm 10 menit sambil diaduk. Dinginkan pada suhu kamar lalu ditambah 55 ml akuades dan digojog hingga larut. Disaring dan disimpan pada suhu kamar dalam botol berwarna gelap. Setiap tiga hari penyimpanan biasanya terdapat endapan untuk itu sebelum digunakan sebaiknya digojog dan disaring lagi (Wheat Genetics Resource Center, 1997 dengan perubahan).

Pembuatan Preparat. Ujung akar dipotong 3-5 mm, dimasukkan dalam botol flakon berisi 2-3 ml kolkisin 0,2% dan disimpan dalam lemari es bersuhu 5° C selama 2-4 jam, lalu dicuci dengan akuades tiga kali, kemudian difiksasi dengan asam asetat 45% dan disimpan dalam lemari es bersuhu 5° C selama 15 menit, lalu dicuci dengan akuades tiga kali. Dilanjutkan hidrolisis dengan asam klorida 1N dalam oven bersuhu 60° C selama \pm 3 menit, tergantung besarnya ujung akar, lalu dicuci dengan akuades tiga kali. Diwarnai dengan asetokarmin selama 1-3 jam tergantung ukuran bahan dan kesegaran pewarna pada suhu kamar. Diambil 1-2 ujung akar dengan kuas diletakkan di atas gelas benda dan dipotong hingga tersisa 1-2 mm lalu ditetesi gliserin, ditutup dengan gelas penutup dan

disquash hingga merata (Soesanti dan Setyawan, 2000; Anggarwulan dkk., 1999).

Pengamatan. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya terhadap 10 akar bawang merah yang berasal dari 10 individu, dimana masing-masing akar diambil sekurang-kurangnya 1 sel yang sedang mengalami pembelahan tahap metafase (prometafase) dari berbagai tingkat ploidi. Untuk memperbaiki daya pisah digunakan minyak imersi dengan perbesaran kuat. Preparat yang baik dan mewakili tipe-tipe ploidi yang ditemukan dipotret dengan kamera mikrofotografi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian yang dilakukan terhadap ujung akar *A. ascalonicum* dengan perlakuan kolkisin 1%, diketahui terjadi perubahan jumlah (penambahan dan pengurangan), ukuran dan bentuk kromosom (sifat-sifat morfometri). Variasi tingkat ploidi, dan data morfometri kromosom yang meliputi rata-rata luas sel, modus ukuran panjang kromosom dan modus bentuk kromosom disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

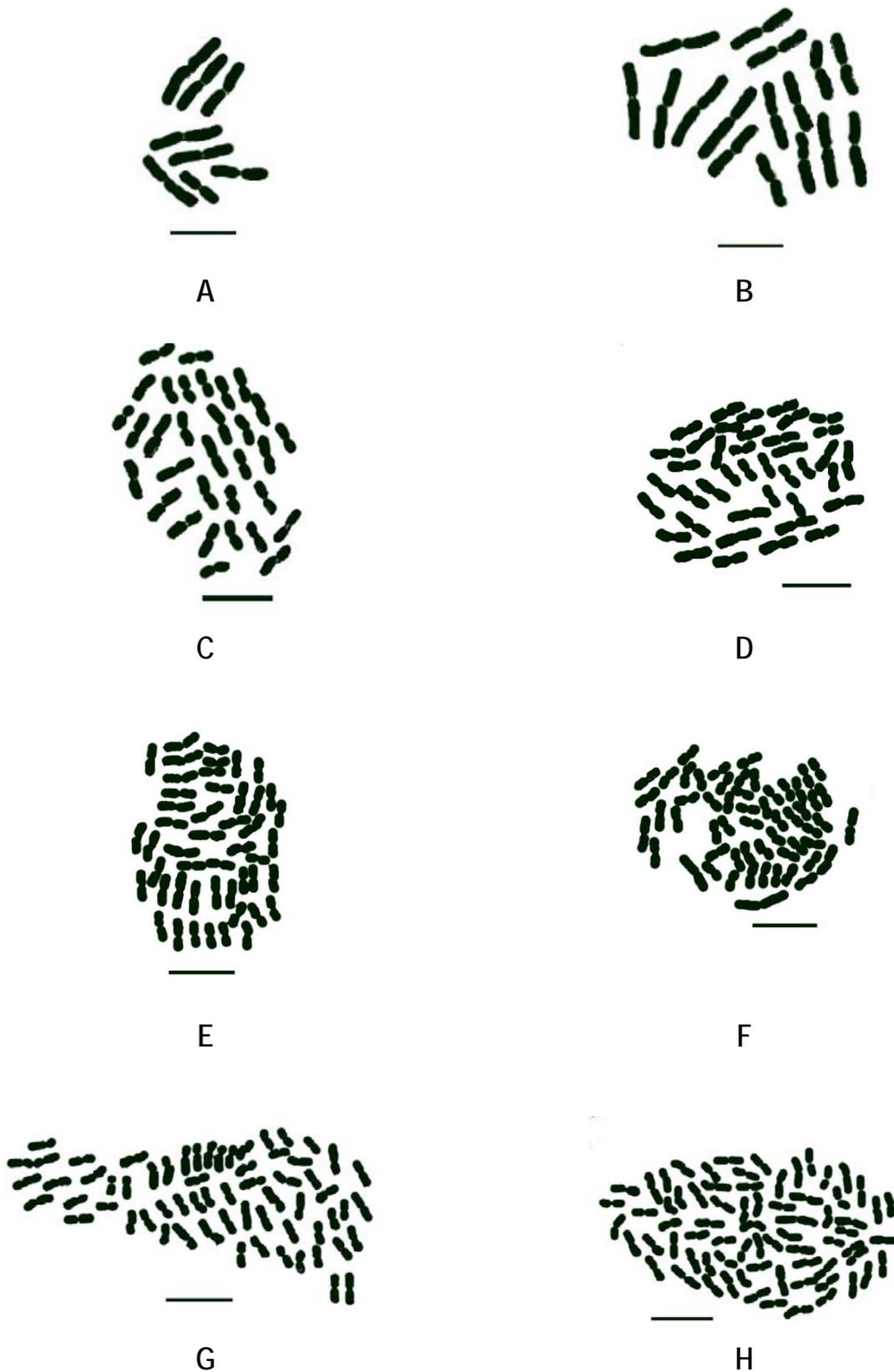
Perlakuan kolkisin

Induksi kolkisin merupakan mekanisme yang sering digunakan untuk mendorong terjadinya mutasi, sehingga terjadi perubahan bentuk, ukuran dan jumlah kromosom (pengurangan dan penambahan). Dalam penelitian ini perubahan yang terjadi ditandai secara visual dengan membesarnya ujung akar (Jw: *jendulan*). Kolkisin dengan kadar 1% merupakan ambang batas tertinggi yang

Tabel 1. Variasi ploidi dan ukuran sel pada *A. ascalonicum* dengan perlakuan kolkisin 1%.

Kelompok	Jumlah ploidi	Mean luas sel (μm^2)	Modus ukuran kromosom (μm)	Modus bentuk kromosom
Haploid	n	9,07	1	metasentris
Diploid	2n	10,17	1	metasentris
Tetraploid	4n	29,26	0,5	metasentris
Pentaploid	5n	38,00	0,5	metasentris
Heksaploid	6n	41,21	0,4	metasentris
Septaploid	7n	51,37	0,4	metasentris
Oktaploid	8n	55,66	0,4	metasentris
Nonaploid	9n	67,88	0,3	sub-metasentris

Keterangan: triploid (3n) tidak ditemukan.



Gambar 1. Variasi ploidi pada *A. ascalonicum* dengan perlakuan kolkisin 1%. A. monoploid (1n), B. diploid (2n), C. tetraploid (4n), D. pentaploid (5n), E. heksaploid (6n), F. septaploid (7n), G. oktaploid (8), dan H. nonaploid (9n). Tipe triploid (3n) belum dapat ditemukan. Garis = 1 μ m.

diperkenankan oleh Eigsti dan Dustin (1957) untuk menginduksi terjadinya mutasi. Kolkisin dengan konsentrasi yang demikian tinggi ini diberikan dengan harapan daya kerjanya maksimal.

Menurut Eigsti dan Dustin (1957) kolkisin dapat bekerja secara efektif pada konsentrasi 0,001-1%, dengan lama perendaman 6-72 jam. Namun pada dasarnya setiap tumbuhan mempunyai respon yang berbeda-beda, tergantung jenis dan organ yang diberi perlakuan. Menurut Setyawan (2001, komunikasi pribadi) konsentrasi kolkisin 1% belum menyebabkan keracunan/kematian akar pada kebanyakan tanaman bawang budidaya (genus *Allium*), dan belum menggumpalkan materi DNA kromosom, sehingga dapat digunakan untuk menelusuri adanya mutasi dengan hasil memuaskan.

Sifat morfometri

Dalam penelitian ini didapatkan ukuran kromosom *A. ascalonicum* relatif pendek dengan posisi yang tumpang tindih. Posisi demikian tetap terjadi meskipun pada saat pembelahan mitosis dinding inti hilang dan ruang sebar kromosom dalam sel meluas. Penumpukan ini mempersulit pengamatan, sehingga bentuk, ukuran dan jumlah kromosom ditentukan secara garis besar, dimana bentuk dan ukuran kromosom hanya dihitung sebagai modus, didasarkan pada kromosom/sel dengan frekuensi tertinggi, sedangkan jumlah kromosom dihitung sebagai pendekatan terhadap jumlah dasarnya (x). Penelitian ini masih merupakan penelitian awal untuk menelaah sifat morfometri dan poliploid *A. ascalonicum* akibat pemberian kolkisin 1%.

Dalam penelitian ini didapatkan modus ukuran panjang kromosom *A. ascalonicum* berkisar antara 0,3-1 μm (Tabel 1.). Ukuran panjang kromosom menurun sejalan dengan bertambahnya jumlah kromosom atau bertambahnya tingkat ploidi kromosom, dari monoploid (1n) ke nonaploid (9n). Hal ini juga diikuti dengan bertambahnya rata-rata ukuran luas sel, namun bertambahnya kapasitas sel tidak sebanding dengan bertambahnya jumlah kromosom, sehingga ukuran kromosom mengecil agar semuanya dapat dikemas dalam sel. Dengan demikian semakin tinggi tingkat ploidi, maka ukuran luas sel semakin besar dan ukuran panjang kromosom semakin kecil.

Bentuk kromosom *A. ascalonicum* relatif seragam (Tabel 1.). Pada level ploidi monoploid (1n) hingga oktaploid (8n), kromosom yang paling sering dijumpai berbentuk metasentris, sedangkan pada individu nonaploid (9n), kromosom yang paling sering dijumpai berbentuk sub-metasentris. Seringnya ditemukan kromosom berbentuk metasentris merupakan hal yang wajar, mengingat kelompok tumbuhan umumnya memiliki kromosom dengan bentuk demikian. Menurut Setyawan (2001, komunikasi pribadi) kebanyakan tanaman bawang budidaya bersifat diploid dengan jumlah kromosom dasar delapan ($x=8$), sehingga $2n = 16$, dimana panjang kromosom berkisar 2 μm , dan kebanyakan berbentuk metasentris.

Tingkat ploidi

Pengaruh kolkisin dalam menginduksi mutasi bersifat acak, sehingga dalam penelitian ini dapat ditemukan individu sel yang tetap bersifat diploid (2n), sebagaimana umumnya sel normal. Serta sel-sel yang mengalami pengurangan jumlah kromosom, yakni bersifat monoploid/haploid (1n) dan sel-sel mengalami penambahan jumlah kromosom atau poliploid yang meliputi: tetraploid (4n), pentaploid (5n), heksaploid (6n), septaploid (7n), oktaploid (8n) dan nonaploid (9n) (Tabel 1.). Tipe triploid (3n) belum dapat ditemukan meskipun secara hipotesis sangat mungkin terbentuk. Hal ini dimungkinkan karena sel dengan jumlah kromosom tersebut tidak terambil pada pengambilan sampel.

Dalam penelitian ini ditemukan adanya sel-sel normal yang tidak mengalami perubahan jumlah kromosom, bersifat diploid (2n) serta berbagai perubahan jumlah kromosom secara euploid yang melahirkan individu poliploid dan perubahan jumlah kromosom secara aneuploid yang menyebabkan jumlah kromosom berkurang atau sedikit berbeda dengan jumlah kelipatan dasarnya (aberasi; anomali). Salah satu bentuk aberasi kromosom yang ditemukan adalah berkurangnya jumlah kromosom karena hilangnya segmen-segmen kromosom (delesi). Hal ini terlihat dengan adanya kromosom monoploid (haploid), yang merupakan delesi dari kromosom normal diploid (2n). Selain itu ditemukan pula adanya penambahan materi genetik pada suatu kromosom (duplikasi). Banyaknya sel dengan jumlah kromosom poliploid yang tidak tepat sebagai kelipatan

jumlah dasarnya, kemungkinan merupakan akibat delesi dan duplikasi kromosom.

Dalam penelitian ini ditemukan pula penambahan jumlah kromosom secara euploid yang menyebabkan terbentuknya sel-sel poliploid. Berbeda dengan prosedur transgenik yang lebih terarah, induksi bahan kimia atau radiasi bersifat acak dan tidak teratur, sehingga memberikan efek yang tidak seragam pada masing-masing sel dalam suatu individu. Tipe-tipe poliploid yang ditemukan adalah tetraploid (4n), pentaploid (5n), heksaploid (6n), septaploid (7n), oktaploid (8n) dan nonaploid (9n). Tipe triploid (3n) belum dapat ditemukan.

Perubahan jumlah kromosom ini disebabkan pemberian kolkisin dengan konsentrasi yang kritis dapat mencegah terbentuknya benang-benang mikrotubuli dari gelendong inti (benang-benang spindel) sehingga pemisahan kromosom yang menandai perpindahan dari tahap metafase ke anafase tidak berlangsung dan menyebabkan penggandaan kromosom tanpa penggandaan dinding sel. Oleh karena tidak terbentuk benang spindel maka kromosom tetap dalam sitoplasma. Namun kromosom dapat memisah dari sentromernya dan dimulai tahap c-anafase yang dilanjutkan dengan pembentukan dinding inti. Sehingga terjadi "restitusi" inti dan mengandung jumlah kromosom berlipat dua. Apabila konsentrasi kritis ini dibiarkan terus berlanjut maka pertambahan genom akan mengikuti deret ukur (Suryo, 1995).

Dalam penelitian ini penghitungan jumlah kromosom dilakukan secara pembulatan, mengingat mutasi sering terjadi secara euploid, dimana perubahan jumlah kromosom sering kali merupakan kelipatan jumlah kromosom dasarnya. Sehingga mayoritas sel akan memiliki kromosom dalam jumlah kelipatan dasarnya. Apabila jumlah kromosom yang terhitung berada di atas atau di bawah kelipatan jumlah kromosom dasar, maka dapat diduga telah terjadi delesi atau duplikasi pada, namun hal ini juga dapat merupakan akibat kesalahan teknis penghitungan, oleh karena itu dipilih pembulatan.

Dalam dunia pertanian, peningkatan keanekaragaman genetik akibat mutasi, rekombinasi serta separasi dan segregasi selama meiosis merupakan sumber plasma nutfah untuk pemuliaan tanaman. Keanekaragaman ini dapat terjadi secara spontan dengan laju yang rendah atau dapat

diinduksi oleh pengaruh kimia dan fisik dengan mematahkan kromosom atau mengubah perilakunya selama pembelahan meiosis atau mitosis (Crowder, 1986).

Keanekaragaman ini memungkinkan untuk mengetahui banyak karakter gen, sehingga aberasi dan poliploidi mempunyai nilai tinggi dalam penemuan kultivar unggul. Tanaman poliploid biasanya lebih kuat dari pada tanaman diploid, ukuran daun, batang, bunga, buah, dan inti sel lebih besar, kandungan vitamin dan protein bertambah, tekanan osmotik berkurang, serta pembelahan sel melambat, sehingga umur vegetatif lebih lama (Suryo, 1995).

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa telah terjadi variasi bentuk, ukuran, dan jumlah kromosom *Allium ascalonicum* L. akibat pemberian kolkisin 1%. Poliploidi yang terbentuk dapat dikelompokkan menjadi tetraploid, pentaploid, heksaploid, oktaploid, dan nonaploid akibat pemberian kolkisin 1%.

DAFTAR PUSTAKA

- Crowder, L.V. 1986. *Genetika Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Eigsti, O.J. dan Dustin, P. 1957. *Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry*. Ameslowa: The Iowa State College Press.
- Anggarwulan, E., N. Etikawati, dan A.D. Setyawan. 1999. Karyotipe kromosom pada tanaman bawang budidaya (Genus *Allium*; Familia Amaryllidaceae). *BioSMART* 1 (2): 13-19.
- Muhlizah, F. dan S. Hening-S. 2000. *Sayur dan Bumbu Dapur Berkhasiat Obat*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Soesanti, N. dan A.D. Setyawan. 2000. *Petunjuk Praktikum Mikroteknik Hewan dan Tumbuhan*. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA UNS.
- Pai, A.C. 1992. *Dasar-dasar Genetika*. edisi kedua (Penerjemah: M. Apandi). Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Rukmana, R. 1994. *Bawang Merah, Budidaya dan Pengolahan Pascapanen*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Wibowo, S. 1991. *Budidaya Bawang Putih, Bawang Merah dan Bawang Bombay Edisi Keempat*. Jakarta: Penerbit Swadaya.

- Suryo. 1995. *Sitogenetika*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wheat Genetics Resource Center. 1997. *Acetocarmine Staining*. <http://www.ksu.edu/wgrc/Protocols/Cytogenetics/acetocarmine.html>