

Pengaruh Hidroksiquinolin Pada Pembuatan Preparat Kromosom Akar dan Kalus Bawang Putih (*Allium sativum* L.)

Arbaul Fauziah^{1)*}

¹⁾ Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan Tumbuhan dan Mikroteknik, Program Studi Sarjana Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

Diterima 02 Desember 2014, direvisi 27 Maret 2015

ABSTRAK

Metode pembuatan preparat kromosom yang tepat memudahkan dalam penghitungan jumlah kromosom, terutama untuk analisis tingkat ploidi tanaman. Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan tanaman yang jumlah kromosomnya sulit dihitung karena kromosomnya panjang dan sulit berpisah ketika di-squash. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hidroksiquinolin pada pembuatan preparat kromosom akar dan kalus bawang putih. Pembuatan preparat dilakukan melalui tahapan-tahapan yaitu fiksasi dengan larutan Farmer, perendaman dalam hidroksiquinolin selama 1 jam, hidrolisis dengan HCl 1N selama 2 menit pada suhu 60°C, perendaman dalam Carnoy selama 30 menit, dan pewarnaan dengan aceto orcein 1% selama 20 menit. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian hidroksiquinolin selama 1 jam setelah perendaman dalam larutan fiksatif dan sebagai kontrol adalah pembuatan preparat tanpa pemberian hidroksiquinolin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode pembuatan preparat melalui perendaman dengan hidroksiquinolin selama 1 jam setelah fiksasi dapat menghasilkan kromosom dengan warna yang tajam dan kontras serta menghasilkan pemisahan kromosom yang tegas, baik pada kalus maupun ujung akar bawang putih.

Kata kunci : akar, bawang putih, hidroksiquinolin, kalus, kromosom

ABSTRACT

The effective method in making chromosome preparation was able to count the number of chromosome easier, especially for analysis the ploidy level in plants. Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the plants that the chromosome is difficult to be counted because their chromosomes are long and difficult to spread during the squashing. This research was to find out the effect of hydroxiquinoline on making chromosome preparation of root and callus in garlic. The steps of making chromosome preparation were fixation in Farmer's fluid, put in hydroxiquinoline for an hour, hydrolysis in 1N HCl for two minutes at 60°C, put in Carnoy for 30 minutes, and stained in 1% aceto orcein for 20 minutes. The treatment were gift hydroxiquinoline for an hour after put in fixative fluid and the control were making preparation without gift hydroxiquinoline. The result of this research suggest that the method of making preparation by treatment with hydroxiquinoline for an hour after fixation produced the chromosomes that the stain were sharp and contrast, and also it produced well spread chromosomes that were clearly defined of both callus and root tip in garlic.

Keywords : *Allium sativum* L., Hydroxiquinoline, callus, chromosome, root

PENDAHULUAN

Pembuatan preparat dengan metode *squash* melalui berbagai modifikasi metode telah

dilaporkan. Dalam aplikasinya, metode-metode tersebut melibatkan agen kimia dan fisika yang diberikan sebelum bahan difiksasi atau *pretreatment*. Suatu metode pembuatan preparat kromosom yang tepat dapat menghasilkan pewarnaan kromosom yang jelas dan pemisahan kromosom yang baik, sehingga memudahkan dalam penghitungan jumlah

*Corresponding author:
E-mail: arbaulfauziah@gmail.com

kromosom. Kemudahan penghitungan jumlah kromosom sangat dibutuhkan untuk analisis tingkat ploidi tanaman, baik dari akar, kalus, maupun bagian tumbuhan lainnya [1].

Beberapa bahan kimia yang digunakan untuk meningkatkan kualitas preparat kromosom telah dilaporkan. Penggunaan α -bromonaphthalene, p-dichloro-benzene, dan 2 mM 8-hidroksiquinolin pada suhu 14°C selama 5 jam pada akar strawberry sebelum fiksasi menghasilkan preparat kromosom akar yang lebih jelas [1]. Indeks metafase yang tinggi diperoleh oleh Mirzaghaderi [2] dengan pemberian perlakuan es pada suhu 0°C selama 24 jam dan 0,05% kolkisin pada suhu 26°C selama 3 jam. Sedangkan Tjio & Levan [3] memberikan 0,002M hidroksiquinolin selama 3-4 jam dengan suhu 15°C pada akar *Agropyron* dengan hasil dapat meningkatkan ketajaman / kontras kromosom. Menurut Ahloowalia [4] bahwa penggunaan α -bromonaphthalene dengan Carnoy sebagai fiksatif dan aceto orcein sebagai pewarna dapat menghasilkan kromosom yang berpenyebaran pada pembuatan preparat ujung akar *Lolium*.

Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan tanaman yang sulit dihitung jumlah kromosomnya karena memiliki kromosom yang panjang dan sulit berpisah ketika di-squash. Bagian tanaman yang umum digunakan untuk membuat preparat kromosom adalah ujung akar karena terdiri dari sel-sel meristem yang aktif membelah. Namun demikian, jaringan-jaringan lain dapat juga digunakan untuk pengamatan kromosom, seperti pucuk tunas [5], kalus, dan protoplas [6].

Pembuatan preparat kromosom akar dengan pemberian hidroksiquinolin sebelum fiksasi telah dilakukan pada tanaman *Lolium* [4], strawberry [1], dan *Isodon* (Lamiaceae) [7] serta kromosom kalus pada tanaman *Asparagus officinalis* L. [8], jagung [9], dan *Anthurium* [5]. Penggunaan hidroksiquinolin pada penelitian ini diaplikasikan pada pembuatan preparat akar dan kalus bawang putih (*Allium sativum* L.) yang diberikan setelah fiksasi. Sebagai kontrol yaitu pembuatan preparat kromosom tanpa pemberian hidroksiquinolin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian hidroksiquinolin setelah fiksasi terhadap kualitas preparat kromosom akar dan kalus bawang putih (*Allium sativum* L.). Serta bertujuan untuk mengevaluasi kemampuannya

dalam pemisahan kromosom.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akar dan kalus bawang putih (*Allium sativum* L.), etanol absolut, asam asetat glasial, hidroksiquinolin, HCl 1N, larutan Carnoy (6 etanol: 3 kloroform: 1 asam asetat glasial), aceto orcein, dan entelan sebagai perekat.

Penelitian ini meliputi dua kegiatan yaitu persiapan bahan serta pembuatan preparat kromosom akar dan kalus bawang putih. Ada dua hal yang diamati pada preparat kromosom akar dan kalus bawang putih, yaitu kemampuan pemisahan kromosom dan ketajaman pewarnaan kromosom dibandingkan dengan sitoplasma sekelilingnya.

Persiapan bahan. Bawang putih (*Allium sativum* L.) diambil bagian meristem basal dan dikulturkan pada media induksi akar, yaitu media MS + NAA 1 ppm dan media induksi kalus, yaitu media MS + 2,4-D 0.5 ppm + kinetin 1 ppm. Kalus yang digunakan sebagai bahan adalah kalus friable yang berumur 1 bulan, sedangkan akar bawang putih dipanen pada umur 2 minggu setelah penanaman pada media kultur.

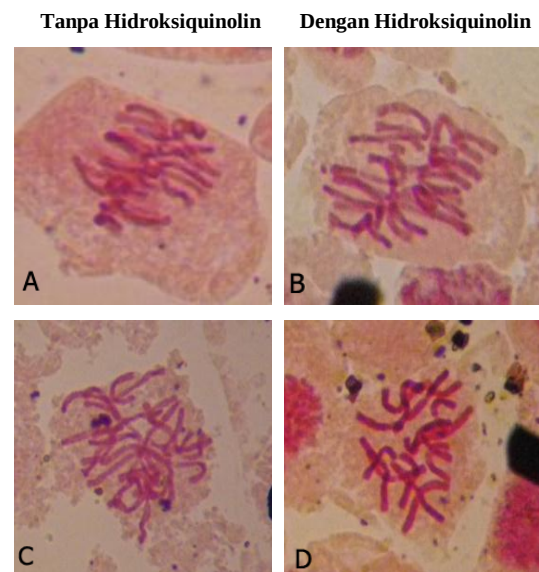
Pembuatan preparat kromosom akar dan kalus bawang putih. Akar dipotong 1 cm dari ujung akar dan kalus dipilih yang friable. Potongan akar dan kalus friable difiksasi dalam larutan Farmer (etanol absolut dan asam asetat glasial 3:1) selama 30 menit dan disimpan pada suhu 5°C. Akar atau kalus yang telah difiksasi direndam dalam 0,002 M hidroksiquinolin selama 1 jam untuk perlakuan dan tanpa pemberian hidroksiquinolin untuk kontrol. Akar atau kalus selanjutnya dihidrolisis dengan larutan HCl 1N pada suhu 60°C selama 2 menit. Akar atau kalus dipindahkan ke dalam larutan Carnoy selama 30 menit, kemudian diwarnai menggunakan aceto orcein 1% selama 20 menit. Akar atau kalus diletakkan di atas gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup serta di-squash. Preparat kromosom akar dan kalus bawang putih diamati menggunakan mikroskop cahaya (binokuler) Olympus CX 21LED pada perbesaran 400×.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis kromosom akar dengan metode *squash* umumnya menghasilkan kualitas pemencaran kromosom yang kurang baik, yaitu kromosom sering menumpuk sehingga menyulitkan dalam penghitungan kromosom [10]. Pada penelitian ini diuji pengaruh pemberian hidroksiquinolin dalam pembuatan preparat kromosom akar dan kalus bawang putih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian hidroksiquinolin membantu meningkatkan pemencaran kromosom. Pada penelitian ini terbukti bahwa pemberian hidroksiquinolin pada pembuatan preparat kromosom setelah bahan difiksasi dalam larutan Farmer menghasilkan pemencaran dan ketajaman warna kromosom yang baik, demikian juga dengan batas-batas antar kromosom. Dengan kata lain kualitas preparat kromosom yang diberi perlakuan hidroksiquinolin jauh lebih baik dibandingkan tanpa hidroksiquinolin (kontrol). Pada penelitian ini dilaporkan bahwa pemberian hidroksiquinolin yang dikombinasikan dengan etanol absolut: asam asetat glasial (3:1) sebagai fiksatif dan larutan Carnoy sebagai bahan pengeras, serta aceto orcein sebagai pewarna membantu mempertajam hasil pewarnaan kromosom. Kromosom pada preparat kromosom akar dan kalus tanpa pemberian hidroksiquinolin tidak dapat memisah dengan baik dan warna kromosom kurang kontras (Gambar 1 A, C), sedangkan kromosom pada preparat kromosom akar dan kalus dengan pemberian hidroksiquinolin mampu memisah dengan baik, menghasilkan warna yang lebih kontras, dan batas-batas antar kromosom lebih jelas (Gambar 1 B, D).

Perlakuan hidroksiquinolin sesudah fiksasi meningkatkan kekontrasan kromosom dan intensitas pewarnaan preparat. Dengan hasil kromosom yang lebih kontras pada pembuatan preparat kromosom ini, hidroksiquinolin diduga mempunyai efek yang sama dengan oksikuinolin yaitu meningkatkan viskositas sitoplasma. Tjio & Levan [3] menyebutkan bahwa oksikuinolin selain dapat meningkatkan viskositas sitoplasma juga dapat meningkatkan kekontrasan kromosom, serta menyebabkan inaktivasi benang-benang spindel. Pada penelitian-penelitian sebelumnya, pemberian

hidroksiquinolin dilakukan sebelum bahan difiksasi [1, 3, 7], sehingga disebut sebagai *pretreatment*, sedangkan pada penelitian ini hidroksiquinolin diberikan setelah bahan fiksasi.



Gambar 1. Pengaruh pemberian hidroksiquinolin terhadap pemencaran dan ketajaman warna kromosom akar (A, B) dan kalus (C, D)

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, pengamatan kromosom bawang putih *in vitro* dapat dilakukan pada sampel kalus sehingga tidak perlu induksi akar. Teknik ini dan pengembangannya bisa digunakan untuk pembuatan preparat kromosom kultivar bawang lainnya. Namun, untuk spesies lain bisa menggunakan modifikasi-modifikasi metode lainnya untuk memperoleh gambaran kromosom yang lebih tajam. Pada penelitian selanjutnya perlu juga dicoba pembuatan preparat kromosom untuk bawang putih dengan pemberian hidroksiquinolin sebelum fiksasi dibandingkan dengan setelah fiksasi.

KESIMPULAN

Metode pembuatan preparat untuk analisis kromosom akar dan kalus bawang putih (*Allium sativum* L.) dengan pemberian hidroksiquinolin setelah difiksasi dengan etanol absolut dan asam asetat glasial (3:1) selama 1 jam, hidrolisis dengan HCl 1N selama 2 menit pada suhu 60°C, perendaman dalam Carnoy (6 etanol: 3 kloroform: 1 asam asetat glasial)

selama 30 menit, dan pewarnaan dengan aceto orcein 1% selama 20 menit dapat menghasilkan kromosom dengan warna yang tajam dan kontras serta menghasilkan pemisahan kromosom yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Owen, H. R. & A. Raymond Miller (1993). A Comparison of Staining Techniques for Somatic Chromosomes of Strawberry. *Hortscience* 28 (2):155-156.
- [2] Mirzaghadari, G. (2010). A Simple Metaphase Chromosome Preparation from Meristematic Root Tip Cells of Wheat for Karyotyping or In Situ Hybridization. *African Journal of Biotechnology*, 9 (3): 314-318.
- [3] Tjio, J. H. & Levan, A. (1950). The Use of Oxyquinoline in Chromosome Analysis. - *Anales Est. Exp. Aula Dei* (2): 2144.
- [4] Ahloowalia, B. S. (1965). A Root Tip Squash Technique for Screening Chromosome Number in *Lolium*. *Euphytica* (14): 170-172.
- [5] Winarto, B. (2011). Pewarnaan Kromosom dan Pemanfaatannya dalam Penentuan Tingkat Ploidi Eksplan Hasil Kultur Anter *Anthurium*. *J. Hort* 21 (2): 113-123.
- [6] Nishibayashi, S., Hayashi, Y., Kyojuka, J. & Shimamoto K. (1989). Chromosome Variations in Protoplast Derived Calli and in Plant Regenerated from the Calli of Cultivated Rice (*Oryza sativa* L.). *Jpn. J. Genet*, 64: 355-361.
- [7] Yamasiro, T., Kazuo, S. & Masayuki, M. (2005). Chromosome Numbers of *Isodon* (Lamiaceae) in Japan. *Acta Phytotax, Geobot.* 56 (3): 241-246
- [8] Araki, H., H. Shimazaki, Y. Hirata, T. Oridate, T. Harada, dan T. Yakuwa, (1992). Chromosome Number Variation of Callus Cells and Regenerated Plants in *Asparagus officinalis* L. *Plant Tissue Culture Letters* 9 (3): 169-175).
- [9] Fluminhan, A., M.L.R.D. Perecin, dan J.A. Dos Santos, (1996). Evidence for Heterochromatin Involvement in Chromosome Breakage in Maize Callus Culture. *Annals of Botany* 78: 73-81.
- [10] Anamthawat, J. K. 2003. Preparation of Chromosomes from Plant Leaf Meristems for Karyotype Analysis and In Situ Hybridization. *Methods Cell Sci.* 21: 91-95