



**PENENTUAN JUMLAH KROMOSOM PADA TIGA KULTIVAR
BROKOLI BL 10001, ROYAL GREEN, DAN GREEN MAGIC**

**COUNTING CHROMOSOME NUMBER IN PRODUCTION HOMOZIGOUS
LINE WITH MICROSPORE CULTURE BROCCOLI BL 10001, ROYAL
GREEN AND GREEN MAGIC**

Septarini Dian Anitasari^{1*}, Ida Ayu Astarini², Made Pharmawati³, Made Ria
Defiani⁴, Dian Catur Prayantini⁵, Dwi Nur Rikhma Sari⁶

^{1,6}Pendidikan Biologi FPMIPA IKIP PGRI Jember, Jl. Jawa 10, Jember, 68124
^{2,3,4,5}MIPA Biologi Universitas Udayana, Jl Raya Bukit Jimbaran no 9, Denpasar, Kode Pos 80361
Departemen Bioteknologi, PT. Bisi International Tbk. Pare Kediri 64212⁶
E-mail penulis: septarini@ikipjember.ac.id

ABSTRAK

Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) merupakan sayuran yang memiliki nilai gizi tinggi dan populer di Indonesia. Produksi brokoli di Indonesia rendah karena umumnya kultivar yang ditanam di Indonesia adalah kultivar introduksi. Kultivar introduksi tidak cocok di lingkungan tropis Indonesia sehingga memerlukan upaya pemuliaan tanaman untuk perbaikan kultivar. Salah satu upaya perbaikan kultivar yang populer saat ini adalah kultur mikrospora. Kultur mikrospora dapat memproduksi tanaman homozigot atau galur murni sehingga nantinya dapat dijadikan tetua dalam program pemuliaan tanaman. Penentuan Jumlah kromosom sangat berguna dalam pengembangan kultur mikrospora dan pemuliaan tanaman hibrida. Kultur mikrospora menghasilkan variasi jumlah kromosom yang beragam sehingga pengetahuan jumlah kromosom penting dilakukan dalam kultur mikrospora. Penelitian ini menggunakan 3 kultivar brokoli Green Magic, Royal Green dan BL 10001. Penentuan jumlah kromosom menggunakan metode *Squash* dengan pewarna aceto-orcein pada ujung akar. Hasil penelitian menunjukkan jumlah kromosom pada kultivar BL 10001 adalah 18 kromosom, pada kultivar Royal Green adalah 9 kromosom dan pada kultivar Green Magic adalah 14 kromosom.

Kata kunci: Brokoli, Kultur Mikrospora, Jumlah Kromosom

ABSTRACT

Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) is a vegetable that has high nutritional value and was popular in Indonesia. Broccoli production in Indonesia is low because generally cultivars grown in Indonesia are introduced cultivars. Introduced cultivars are not suitable in the tropical environment of Indonesia, so it requires plant breeding efforts to improve cultivars. One of the most popular efforts to improve cultivars today is microspores culture. Microspora culture can produce homozygous plants or pure lines so that later it can be made an elder in a plant breeding program. Determination of the number of chromosomes is very useful in the development of microspores culture and hybrid plant breeding. Microspora culture produces variations in the number of chromosomes that are diverse, so the knowledge of the number of chromosomes is important to do in the culture of microspores. This study used 3 broccoli cultivars of Green Magic, Royal Green and BL 10001. Determination of the number of chromosomes using the Squash method with aceto-orcein coloring at the root tip. The results showed the number of chromosomes in BL 10001 cultivar was 18 chromosomes, the Royal Green cultivar was 9 chromosomes and the Green Magic cultivar was 14 chromosomes.

Keywords: Broccoli, Microspore Culture, Number of Chromosome

PENDAHULUAN

Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) merupakan sayuran yang memiliki nilai gizi tinggi dan populer di Indonesia. Brokoli tumbuh pada lingkungan subtropik. Penggunaan kultivar introduksi tidak cocok di lingkungan tropis Indonesia. Pada umumnya brokoli yang ditanam tidak tahan terhadap panas. Diperlukan suhu kurang dari 23⁰C untuk merangsang dan memelihara vernalisasi yang memungkinkan terbentuknya bunga. Apabila temperatur rendah tidak terpenuhi maka fase vegetatifnya yang akan terus berlanjut sedangkan fase pembentukan bunga akan terhambat (Farnham dan Bjorkman, 2011) sehingga produksi brokoli di Indonesia sangat rendah.

Salah satu upaya perbaikan kultivar yang populer saat ini adalah kultur mikrospora. Rendahnya produksi brokoli di Indonesia dapat diatasi dengan kultur mikrospora. Kultur mikrospora merupakan upaya perbanyakan tanaman dengan memproduksi tanaman haploid dan *double haploid*. (Na *et al.*, 2011). Tanaman haploid adalah tanaman yang mempunyai kromosom dengan jumlah separuh dari jumlah kromosom tanaman normal. Tanaman haploid sangat penting dalam pemuliaan tanaman yaitu untuk mendapatkan tanaman homozigot atau galur murni (Santoso dan Nursandi, 2002). Tanaman homozigot atau galur murni yang didapatkan nantinya dapat dijadikan tetua dalam program pemuliaan tanaman.

Kromosom merupakan materi genetik DNA dan RNA yang mengontrol semua aktivitas hidup, termasuk metabolisme dan penurunan sifat. Bentuk, ukuran dan jumlah kromosom setiap spesies pada dasarnya selalu tetap, sehingga sangat bernilai untuk tujuan taksonomi, mengetahui keanekaragaman, hubungan kekerabatan dan evolusi (Campbell *et al.*, 1999). Kultur mikrospora menghasilkan variasi jumlah kromosom yang beragam sehingga pengetahuan jumlah kromosom penting dilakukan dalam kultur mikrospora.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan PT. BISI International di Tulungrejo - Pare, Kediri Jawa Timur selama 9 bulan, mulai dari Juni 2012 hingga Februari 2013. Pengamatan jumlah kromosom dilakukan di laboratorium jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Udayana pada bulan Maret - April 2013.

Alat Dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *water bath*, *ependorf tubes*, mikroskop cahaya, *beaker glass*, gelas benda dan kaca penutup, dan kamera digital. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ujung akar brokoli, Para Dikloro Benzena (PDB), larutan *fiksatif* (*Alkohol absolut dan Asam Asetat Glasial*), *HCL*, *Aceto orcein*, dan *Aquadest*.

Prosedur Penelitian

Persiapan Bahan Tanaman

Tiga kultivar brokoli yaitu Green Magic, Royal Green dan BL 10001 digunakan dalam penelitian ini. Benih didikecambahkan dalam petridish. Petridish yang digunakan dilapisi tissue yang telah dibasahi dengan air selama 3 hari dalam dalam suhu ruang 25⁰C. Pemotongan ujung akar dilakukan pagi hari antara pukul 06.00 – 08.00 WITA.

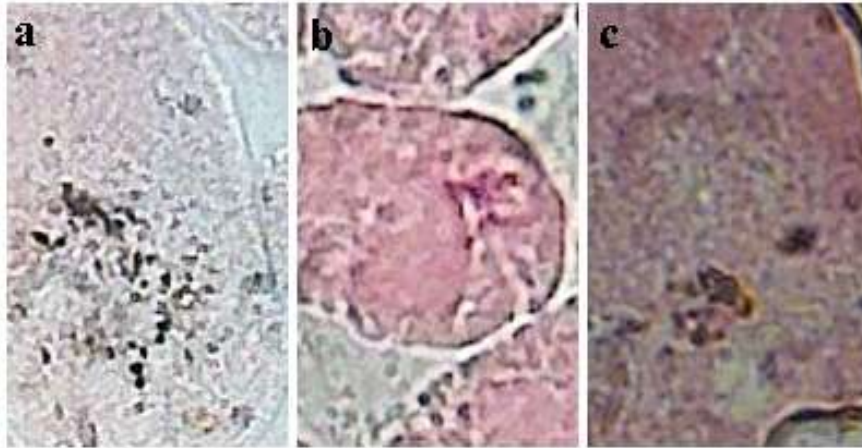
Penghitungan Jumlah Kromosom

Metode yang digunakan untuk perhitungan jumlah kromosom adalah modifikasi dari metode Squash (Chen *et al.*, 2011). Ujung akar dipotong ± 1 mm dan dimasukkan dalam *ependorf tubes* yang berisi Para Dikloro Benzene (PDB) selama 4 jam. Ujung akar kemudian direndam dalam larutan fiksatif yang terdiri dari Alkohol absolut dan Asam Asetat Glasial (3:1) selama 1 jam. Setelah proses fiksasi selesai, tahap selanjutnya adalah hidrolisis ujung akar dengan menggunakan HCL 2 N selama 15 menit dalam *water bath* 60⁰C.

Tahap selanjutnya adalah pewarnaan ujung akar. Setelah larutan hidrolisa dibuang, ujung akar diletakkan di atas gelas benda dan diwarnai dengan larutan *aceto orcein* 2 % sebanyak 1 tetes selama 30 menit. Ujung akar tersebut dipanasi di atas Bunsen selama ± 3 detik. Setelah proses pewarnaan larutan pewarna diserap dengan tissue dan ditutup dengan gelas penutup. Ujung akar diketuk- ketuk secara perlahan dengan pangkal pensil yang tumpul hingga sel terlihat menyebar dan di- squash (ditekan menggunakan ibu jari) agar sel menyebar dan pipih sehingga membentuk lapisan sel yang tipis. Selanjutnya preparat diamati di bawah mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pengamatan mikroskop jumlah kromosom pada kultivar BL 10001 adalah 18 kromosom. Pada kultivar Royal Green terlihat 9 kromosom dan Green Magic terlihat 14 kromosom (Gambar 1.).



Gambar 1. Jumlah kromosom brokoli
(a. BL 10001; b. Royal Green; c. Green Magic)

Jumlah kromosom pada Brassica dapat diketahui dengan teknik analisis sitologi fase mitosis pada ujung akar. Teknik analisis sitologi yang dilakukan yaitu dengan teknik *squash* kromosom (Vasil, 1984). Berdasarkan hasil penelitian, tidak semua kultivar dapat diamati. Jumlah kromosom dari Brassica pada umumnya sudah diketahui. Brokoli memiliki jumlah kromosom $2n = 18$ (Babbar *et al.*, 2004). Pada penelitian ini tidak semua kultivar jumlah kromosomnya 18. Kromosom pada kultivar BL 10001 saja yang terlihat berjumlah 18 kromosom. Pada kultivar Royal Green terlihat 9 kromosom dan Green Magic terlihat 14 kromosom.

Pada setiap spesies, bentuk, ukuran serta jumlah kromosom selalu tetap namun dalam keadaan tertentu kromosom tersebut dapat terjadi variasi. Jumlah kromosom yang berhasil diamati berbeda dengan jumlah kromosom yang telah banyak dipublikasikan dapat terjadi karena ukuran kromosom brokoli kecil. Hal yang sama diamati pada beberapa kultivar *Brassica napus* karena kecilnya ukuran kromosom dan adanya kromosom yang menyatu sehingga kesulitan dalam menghitung jumlah kromosom (Pharmawati *et al.*, 2010). Kecilnya ukuran kromosom pada genus Brassica telah dilaporkan oleh Snowdon *et al.* (2000). Jumlah kromosom pada genus Brassica susah diamati dengan metode konvensional dan

memerlukan teknik yang lebih canggih seperti teknik *molecular Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH). Metode ini dapat melokalisasi pengkodean gen famili. FISH dilengkapi dengan pengolahan data menggunakan komputer sehingga jumlah kromosom dapat diketahui dengan tepat.

Selain itu, teknik pewarnaan yang kurang optimal dapat menyebabkan kromosom tidak terlihat dengan baik (Winarto, 2011). Ada beragam zat pewarna yang digunakan dalam *squash* kromosom di antaranya acetocarmin, aceto-orcein (Vasil, 1984), basic fuchin/ toluidine (Maluszynki *et al.*, 2003) dsb. Zat pewarna kromosom yang biasa digunakan bagi kelompok Brassica adalah aceto-orcein (Vasil, 1984). Pewarna aceto-orcein biasanya menghasilkan gambar yang tajam, kontras yang tinggi, cepat dan proses pengerjaannya sederhana. Namun keberhasilan metode ini dipengaruhi beberapa faktor yaitu pemilihan akar, perlakuan, fiksasi, maserasi, pewarnaan dan proses penyelesaiannya (Winarto, 2011). Minimnya jumlah benih juga menjadi kendala dalam penelitian ini sehingga menjadi keterbatasan peneliti dalam melakukan *squash* kromosom.

Penentuan jumlah kromosom dalam teknik kultur mikrospora mengindikasikan adanya keragaman level ploidi (Winarto, 2011). Informasi jumlah kromosom sangat penting diketahui untuk mengkonfirmasi status tanaman haploid pada saat proses kultur hingga menjadi tanaman *double haploid*. Penghitungan kromosom sebelum dan sesudah kultur mikrospora berfungsi untuk membandingkan jumlah kromosom yang dihasilkan tanaman kultur sehingga dapat dibedakan antara haploid atau *double haploid* (Maluszynski *et al.*, 2003).

KESIMPULAN

Pada penelitian ini tidak semua kultivar jumlah kromosomnya 18. Kromosom pada kultivar BL 10001 saja yang terlihat berjumlah 18 kromosom. Pada kultivar Royal Green terlihat 9 kromosom dan Green Magic terlihat 14 kromosom. Penentuan jumlah kromosom sebelum dan sesudah kultur mikrospora berfungsi untuk membandingkan jumlah kromosom yang dihasilkan tanaman kultur sehingga dapat dibedakan antara haploid atau *double haploid*.

SARAN

Diperlukan optimasi metode *squash* kromosom dengan benih dalam jumlah banyak sehingga jumlah kromosom dapat diketahui dengan baik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterimakasih kepada Laboratorium Kultur Jaringan PT Bisi International TBK dan Laboratorium Kultur Jaringan Biologi Universitas Udayana yang telah memberikan dukungan fasilitas bagi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Babbar, S., Agarwal, P., Sahay, S dan Bhojwani, S. 2004. Isolated Microspore Culture of Brassica: An experimental Tool for Developmental Studies and Crop Improvement. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 185-202.
- Campbell, N., Reece, J dan Mitchell, L. 1999. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Chen, F., yang, K., Zhou, G., Fan, Y., Zhang, Z., Shen, J., Zhang, H dan Zhang, Z. 2010. Karyotype Analysis of Tuber Mustard (*Brassica juncea* Var. Tumida Tsen and Lee) in China. *International Journal of Agriculture and Biology*.
- Farnham, M dan Bjorkman, T. 2011. Breeding Vegetables Adapted to High Temperature: A Case Study with Broccoli. *HortScience* 46: 1093-1097.
- Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B dan Szarejko, I. 2003. *Double Haploid Production in Crop Plants*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Na, H., Hwang, G., Kwak, J., Yoon, M dan Chun, C. 2011. Microspore Derived Embryo Formation and Doubled Haploid Plant Production in Broccoli (*Brassica Oleracea* L. Var Italica) According to Nutritional and Environmental Conditions. *African Journal of Biotechnology* 10(59): 12535-12541.
- Pharmawati, M., Indraningrat, A dan Wirasiti, N. 2010. Chromosomes Observation on Cultivars of *Brassica Napus* L. *Proceeding 2nd International Conference on Biosciences and Biotechnology PA18-PA21*.
- Santoso, U dan Nursandi, F. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- Snowdon, R., Friedt, W., Kohler, A dan Kohler, W. 2000. Characterization of 5S and 25S rDNA Loci for Chromosome Identification in *Oilseed Rape* (*Brassica napus* L.). *Annals of Botany* 86: 200-204.
- Vasil, A. 1984. *Plant Regeneration and Genetic Variability*. Florida: Academic Press, INC.
- Winarto, B. 2011. Pewarnaan Kromosom dan Pemanfaatannya dalam Penentuan Tingkat Ploidi Eksplan Hasil Kultur Anter Anthurium. *Jurnal Hortikultura*. 21(2): 113-123.