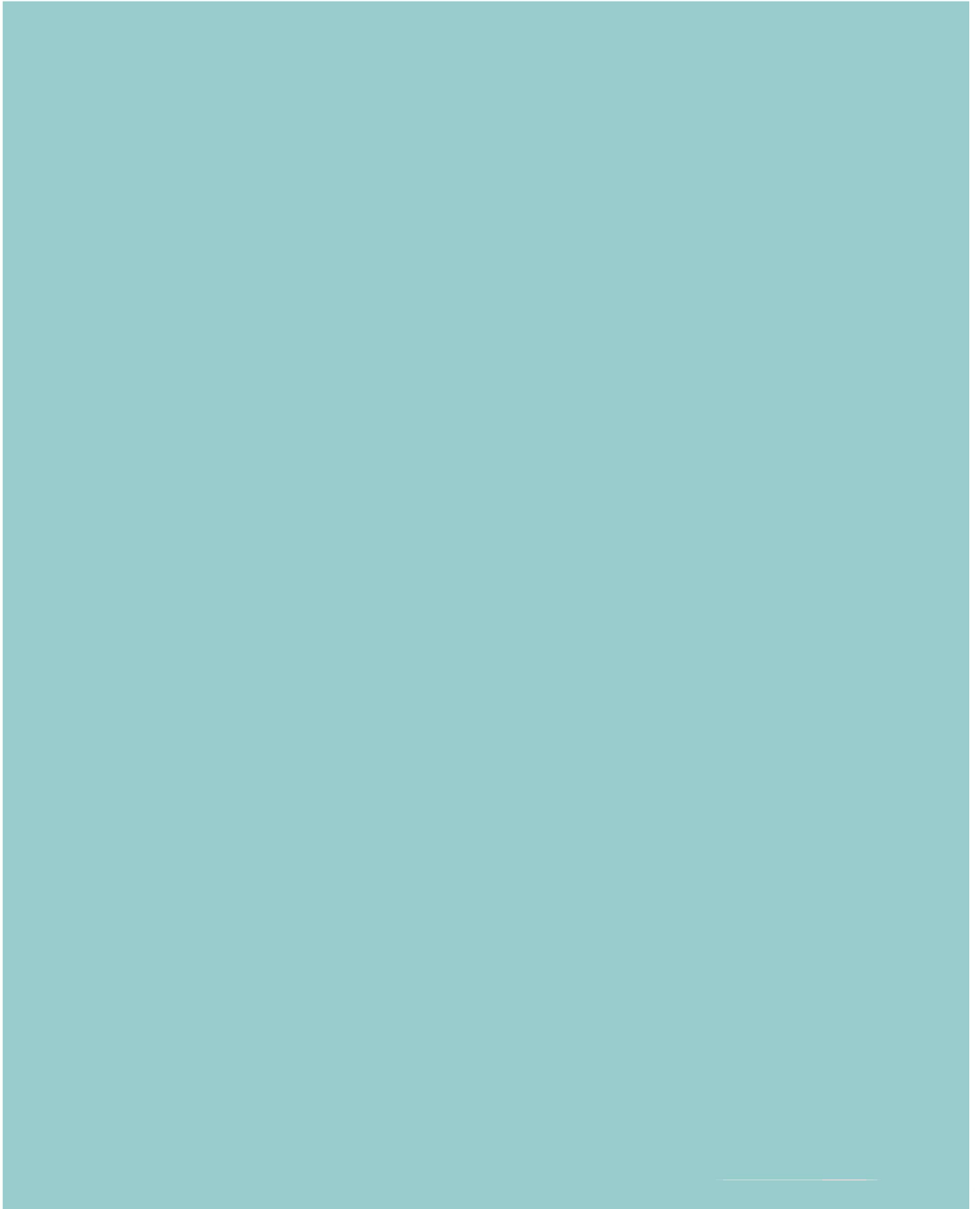




JURNAL ILMIAH
Universitas Batanghari
JAMBI

Volume 4 Nomor 2, Juli 2004



ANALISIS PLOIDI SECARA KONVENSIONAL DAN METODA FLOW CYTOMETRY

Zulkarnain*

Abstract

Ploidy analysis, particularly the assessment on the chromosome number, of a species is a very crucial first step in plant breeding programme. Various ploidy analysis methods have been developed so far. The simplest method has been the staining of chromosomes in root tip or microspore cells. By this technique, the number of chromosomes can be determined precisely, and karyotype study of the chromosomes is likely to be conducted. Other method is by evaluating plant morphology or anatomical characteristics such as stomatal diameter and density, chlorophyll content within guard cells, diameter and viability of pollen grains, and leaf thickness, which are different according to the ploidy levels. Although this method offers a high accuracy, the staining technique or the evaluation of plant characteristics is not reliable to be used to evaluate the ploidy level of large scale population, because it is a time-consuming and laborious work. Now, a useful method for large-scale ploidy analysis, flow cytometry technique, has been developed. Although the initial investment is quite expensive, the benefit it offers for long-term large-scale ploidy analysis has made this method economically sound. This method of ploidy analysis rely on the nuclear DNA staining, which are then analyzed optically using an instrument called flow cytometer. The output of the reading is a histogram having different G1 peak for different ploidy levels. With the use of standard plant of known ploidy, the ploidy level of sample plant can be predicted based on the difference of their G1 peaks. This method is capable to analysis the ploidy level rapidly, but can not determine the number of chromosome. Both conventional and flow cytometry method have their own advantages and disadvantages. The choice of which method is going to be used will much depend upon the availability of resources and the objective of the works.

Key words: flow cytometry, chromosome, plant breeding, ploidy.

PENDAHULUAN

Penentuan tingkat ploidi suatu spesies atau kultivar merupakan langkah penting dalam program pemuliaan tanaman. Seringkali perubahan pada tingkat ploidi suatu tanaman disertai oleh perubahan-perubahan pada tampilan morfologi, respon terhadap kondisi lingkungan tertentu, daya tahan terhadap serangan hama dan penyakit, atau bahkan produktifitasnya. Perubahan-perubahan ini dapat bersifat menguntungkan atau justru sebaliknya.

Penentuan jumlah ploidi sangat banyak diterapkan dalam sistem perbanyakan tanaman melalui teknik

kultur jaringan dikarenakan peluang bagi terjadinya keragaman ploidi pada individu yang diregenerasikan lebih tinggi daripada perbanyakan konvensional. Terjadinya pengurangan atau penggandaan jumlah kromosom dapat berlangsung sebagai akibat pengaruh zat pengatur tumbuh, komposisi medium atau faktor-faktor lain selama periode kultur.

Metoda penentuan ploidi yang paling sederhana adalah secara langsung menghitung jumlah kromosom di bawah mikroskop cahaya dengan bantuan pewarnaan aceto-orcein atau aceto-carmine (Prakash, 2000). Jaringan tanaman atau organ yang dapat

* Dr. Ir. H. Zulkarnain, M.Hort.Sc. Dosen tetap PS Agronomi Universitas Jambi

digunakan untuk tujuan ini adalah ujung akar dan sel induk mikrospora. Cara lain yang juga masih relatif sederhana adalah dengan metoda pewarnaan fluorescein diacetate (FDA) dan diamati di bawah mikroskop ultra violet (Compton *et al.*, 1999). Baik metoda pewarnaan orcein, carmine ataupun FDA dapat digunakan untuk mengkonfirmasi karakteristik organ atau jaringan tanaman yang berbeda sebagai akibat perbedaan tingkat ploidinya. Jaringan atau organ yang dapat dijadikan parameter tingkat ploidi adalah diameter stomata (Borrino dan Powell, 1988; Cramer, 1999), kerapatan stomata per satuan luas (Tan dan Dunn, 1973; Borrino dan Powell, 1988; Cramer, 1999), jumlah kloroplas di dalam sel penjaga (Tenkouano *et al.*, 1998; Compton *et al.*, 1999), diameter serbuk sari serta viabilitas serbuk sari (Tenkouano *et al.*, 1998; Cramer, 1999; Zulkarnain, 2004). Selain itu dapat pula menggunakan parameter morfologi tanaman untuk sebagai indikator tingkat ploidi, seperti ukuran tinggi tanaman, luas daun dan ukuran bunga (Zulkarnain, 2004).

Pesatnya program pemuliaan tanaman menghendaki dukungan metoda analisis ploidi yang cepat, efektif dan efisien, terutama bila seorang pemulia bekerja dengan populasi tanaman yang besar. Hal ini tentu saja tidak mungkin mengandalkan pada teknik pewarnaan konvensional, dan memeriksa ploidi tanaman satu per satu. Oleh karenanya, telah dikembangkan suatu metoda analisis yang sangat handal untuk menentukan tingkat ploidi tanaman dalam jumlah yang besar dan dalam waktu yang cepat, yaitu yang dikenal dengan Flow Cytometry Method (FCM). Metoda ini telah terbukti efektif digunakan pada analisis tingkat ploidi

pada berbagai spesies tanaman (Sgorbati *et al.*, 1986; Dickson *et al.*, 1992; Tosca *et al.*, 1995; Zonneveld dan Iren, 2000; Azhar dan Rusli, 2000a; 2000b; Lin *et al.*, 2001). Tulisan ini bertujuan untuk membahas prosedur kedua metoda analisis ploidi (konvensional dan flow cytometry) dan melihat keunggulan dan kelemahan dari kedua metoda tersebut.

ANALISIS PLOIDI SECARA KONVENSIONAL

Persiapan larutan pewarna

Menurut Prakash (2000), pewarnaan kromosom dengan pewarna orcein memberikan hasil yang lebih baik daripada penggunaan pewarna carmine. Di samping itu pewarnaan dengan orcein tidak menghendaki adanya mordan, sementara pewarna carmine menghendaki adanya mordan (biasanya feri asetat dalam jumlah yang sangat kecil) untuk mendapatkan pewarnaan yang baik. Mordan adalah suatu garam logam yang dapat merubah sifat pewarna tertentu. Dengan adanya mordan akan terbentuk suatu kompleks-pewarna-mordan-jaringan yang tidak larut di dalam alkohol atau pelarut lain yang digunakan dalam mikroteknik.

Baik orcein maupun carmine biasanya dilarutkan di dalam asam asetat glasial panas (Darlington dan LaCour, 1976; Sharma dan Sharma, 1980), namun hasil yang lebih baik akan diperoleh bila dilarutkan di dalam asam propionat (Prakash, 2000). Oleh karena orcein akan mengalami kerusakan dengan cepat bila berada di dalam larutan asam, maka dianjurkan untuk membuat larutan orcein di dalam asam asetat glasial dengan konsentrasi 2,2% (w/v) (sebagai larutan stok), dan diencerkan hingga konsentrasi

akhir 1% beberapa saat sebelum digunakan. Larutan stok orcein hendaknya disimpan di dalam lemari pendingin.

Berikut adalah prosedur untuk mempersiapkan larutan pewarna aceto-orcein dan aceto-carmin. Siapkan 100 mL asam asetat 45% dengan mencampur asam asetat glasial dengan air suling dan panaskan hingga mendidih (di dalam *fume hood*). Kemudian masukkan 2,2 g carmine atau orcein, kocok, dan panaskan selama 5 – 10 menit. Setelah dingin, larutan disaring menggunakan saringan nilon 150 μm . Apabila menggunakan carmine, tambahkan satu larutan ferri asetat jenuh (di dalam asam asetat 45%) sebagai mordant. Apabila menggunakan orcein, langkah ini tidak perlu dilakukan. Larutan pewarna ini dapat disimpan pada suhu 4°C sebelum diencerkan dan disaring lagi pada saat akan digunakan.

Siapan ujung akar (*root tip squash*)

Akar sepanjang lebih-kurang 1 cm diambil dari tanaman setelah kira-kira satu jam tersedia cahaya. Pada kondisi demikian kromosom pada berbagai fase mitosis dapat dijumpai dan diamati dengan jelas di bawah mikroskop.

Akar yang dipanen segera direndam di dalam larutan kolkisin 0,1% selama kira-kira 4 jam pada suhu kamar. Selanjutnya akar tersebut dibilas dengan air suling dan dapat disimpan di dalam alkohol 70% pada suhu 4°C sampai saatnya digunakan, atau dapat langsung digunakan pada prosedur selanjutnya. Pemberian pra-perlakuan dengan larutan kolkisin ditujukan untuk membantu dalam penghitungan jumlah kromosom (Prakash, 2000). Kolkisin adalah senyawa yang menghalangi mitosis dan menghasilkan apa yang disebut sebagai

metafase atau prometafase yang tertambat dengan kromosom yang menyebar atau mengelompok (Vaughan dan Vaughn, 1998), yang dapat diamati dengan mudah menggunakan mikroskop cahaya.

Akar-akar terpilih dikeluarkan dari alkohol dan dicuci bersih dengan air suling untuk membuang sisa-sisa alkohol. Selanjutnya akar tersebut dimasukkan ke dalam botol vial berisi kira-kira 2 mL (sekedarnya cukup untuk merendam spesimen) campuran antara larutan pewarna dengan asam (9 bagian aceto-orcein atau aceto-carmin 1% plus 1 bagian HCl 1 N) untuk hidrolisis. Botol vial selanjutnya dihangatkan secara perlahan-lahan pada sebuah lampu alkohol untuk membantu meningkatkan penyerapan bahan pewarna. Kemudian botol berikut akar di dalamnya didinginkan kira-kira 10 menit hingga mencapai suhu kamar.

Satu potongan akar selanjutnya dikeluarkan dari campuran larutan pewarna-asam dan diletakkan di atas kaca objek bersih. Ujung akar dipotong kira-kira 0,2 – 0,4 mm dari bagian ujung; sisa akar selanjutnya dibuang. Dua tetes aceton-orcein atau aceto-carmin 1% (tanpa HCl) diberikan pada potongan ujung akar tersebut. Kemudian potongan ujung akar dilumatkan dengan menggunakan tangkai spatula sehingga terbentuk larutan berwarna susu. Bila diperlukan dapat ditambahkan satu atau dua tetes larutan pewarna.

Kaca penutup berlapis albumin atau berlapis serum darah (ketebalan No. 1) digunakan untuk menutup spesimen. Kelebihan pewarna dapat dibuang dengan cara menyerapnya menggunakan kertas saring (Whatman No. 1). Kaca objek sekali lagi dihangatkan untuk menghilangkan gelembung udara yang

mungkin terbentuk. Selanjutnya dapat dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah kromosom di bawah mikroskop, dan dilakukan pemotretan bila perlu.

Apabila spesimen ingin di simpan untuk jangka waktu yang agak lama, maka pada tepi kaca penutup dapat diolesi dengan pewarna kuku (kuteks) bening untuk menghindari terjadinya evaporasi. Dengan menempatkan kaca objek di dalam cawan Petri tertutup yang berisi kertas saring lembab, spesimen dapat disimpan pada suhu 4°C dan keadaan gelap total selama kira-kira satu minggu dengan kualitas pewarnaan yang tetap baik.

Siapan antera (*anther squash*)

Tunas bunga dengan ukuran berbeda (tergantung pada spesies tanaman) dapat diisolasi kapan saja dari tanaman induk tanpa tergantung pada kondisi cahaya. Bagian luar bunga (kelopak dan mahkota) dibuang untuk mendapatkan antera. Satu antera diambil dan diletakkan di atas kaca objek, lalu

ditetesi dengan satu atau dua tetes perwarna aceto orcein atau aceto carmine 1% (tanpa HCl) (Prakash, 2000). Bagian tengah antera dipotong menggunakan skalpel bersih dan tajam, lalu kedua ujung antera di tekan untuk memaksa mikrospora keluar. Sisa-sisa antera selanjutnya dibuang.

Spesimen selanjutnya ditutup dengan kaca penutup dan diamati di bawah mikroskop cahaya sebagaimana halnya dengan siapan ujung akar. Selain menghitung jumlah kromosom, diameter dan viabilitas mikrospora dapat ditentukan dengan menggunakan teknik ini. Mikrospora yang viabel akan menyerap pewarna lebih banyak sehingga berwarna lebih pekat, dan sebaliknya, mikrospora yang tidak viabel memiliki warna yang kurang pekat. Beberapa contoh pengamatan diameter dan viabilitas mikrospora disajikan pada Tabel 1. Pada umumnya, mikrospora tanaman diploid lebih kecil daripada tanaman tetraploid, namun memiliki viabilitas yang lebih tinggi.

Tabel 1. Contoh pengamatan diameter dan viabilitas mikrospora pada beberapa spesies tanaman dengan tingkat ploidi yang berbeda.

Tanaman	Tingkat ploidi	Diameter (μm)	Viabilitas (%)	Referensi
<i>Swainsona formosa</i>	Diploid	21,27 \pm 0,22	65,30 \pm 0,83	Zulkarnain (2004)
	Tetraploid	27,72 \pm 0,20	47,35 \pm 0,76	
<i>Pelargonium</i> \times <i>hortorum</i>	Diploid	4,41 \pm 0,36	-	Cramer (1999)
	Tetraploid	5,90 \pm 0,46	-	
<i>Musa</i> sp.	Diploid	100,00 \pm 1,00	90,8 \pm 1,50	Tenkouano <i>et al.</i> (1998)
	Triploid	112,00 \pm 1,00	49,1 \pm 3,30	
	Tetraploid	135,00 \pm 1,00	90,0 \pm 1,10	

Karakteristik stomata

Untuk evaluasi stomata hendaknya gunakan daun-daun dewasa. Pekerjaan ini harus dilakukan pada saat stomata berada dalam keadaan membuka penuh, yakni ketika intensitas cahaya 50 μmol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pada kondisi *in vitro* atau 650 – 1200 $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ untuk kondisi *in vivo*.

Suatu lapisan tipis cat kuku bening dioleskan pada permukaan daun bagian bawah (*abaxial*) atau bagian atas (*adaxial*), tergantung pada spesies

tanaman. Pada tanaman dikotil, umumnya sebaran stomata lebih banyak pada permukaan bawah daun, sedangkan pada tanaman monokotil sebaran stoma baik pada permukaan atas maupun permukaan bawah relatif sama (Esau, 1965). Setelah beberapa menit (cat kuku mengering), daun dipotong dari tanaman dan diletakkan di antara dua lembar kertas saring lembab di dalam cawan Petri untuk menjaga kesegarannya sebelum diamati.

Dengan menggunakan pinset, lapisan cat kuku berikut satu lapis tipis sel-sel epidermis dikelupaskan dan diletakkan pada kaca objek bersih. Kemudian spesimen ditetesi dengan satu atau dua

tetes air bersih untuk meregangkannya, lalu ditutup dengan kaca penutup (ketebalan No. 1). Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya. Untuk diameter stomata, pengukuran dilakukan menggunakan skala mikrometer, yang dipasang pada lensa okuler, terhadap stomata yang membuka penuh. Sementara kerapatan stomata dihitung dengan membandingkan jumlah stomata per satuan luas yang diamati. Dari sejumlah penelitian, didapatkan bahwa pada umumnya tanaman diploid memiliki stomata lebih sempit dengan kerapatan yang lebih tinggi daripada tanaman tetraploid (Tabel 2).

Tabel 2. Contoh pengamatan lebar diameter dan kerapatan stomata pada beberapa spesies tanaman dengan tingkat ploidi yang berbeda.

Tanaman	Tingkat ploidi	Diameter (μm)	kerapatan (mm^{-2})	Referensi
<i>Swainsona formosa</i>	Diploid	$24,19 \pm 0,46$	$116,29 \pm 1,80$	Zulkarnain (2004)
	Tetraploid	$36,54 \pm 0,44$	$39,62 \pm 1,72$	
<i>Pelargonium \times hortorum</i>	Diploid	$2,46 \pm 0,10$	$30,00 \pm 2,36$	Cramer (1999)
	Tetraploid	$3,36 \pm 0,28$	$10,50 \pm 1,35$	

Selain diameter dan kerapatan, karakteristik lain dari stomata yang dapat dijadikan pembeda tingkat ploidi adalah jumlah kloroplas yang terdapat di dalam sel-sel penjaga (Tabel 3). Keakuratan parameter ini telah terbukti pada tanaman *Solanum phureja* (Singsit dan Veilleux, 1991), *Arachis* (Singsit dan Ozias-Akins, 1992) dan *Citrulus vulgaris* (Compton et al., 1999).

Morfologi tanaman

Morfologi tanaman adalah parameter yang paling mudah diamati untuk membedakan tingkat ploidi tanaman. Antara tanaman diploid dan tetraploid terdapat perbedaan morfologi yang nyata

(Cramer, 1999). Variabel morfologi yang dapat diukur adalah tinggi tanaman, luas daun (Zulkarnain, 2004), jumlah daun (Hamill dan Smith, 2002), ukuran umbi (Hamill dan Smith, 2002), ukuran bunga dan panjang tangkai bunga (Zulkarnain, 2004). Pada tanaman tetraploid, luas daunnya cenderung lebih besar daripada tanaman diploid, misalnya pada *Alocasia* (Thao et al., 2003) dan *Swainsona formosa* (Zulkarnain, 2004). Selain itu, helai daun tanaman tetraploid juga lebih tebal daripada tanaman diploid (Cramer, 1999; Zulkarnain, 2004). Pada tanaman jahe, umbi yang berasal dari tanaman tetraploid lebih besar daripada umbi yang berasal dari tanaman diploid

(Hamill dan Smith, 2002). Demikian pula halnya dengan tangkai bunga dan ukuran bunga, di mana dilaporkan oleh Zulkarnain (2004), bahwa tanaman *Swainsona formosa* tetraploid memiliki tangkai yang lebih panjang dengan ukuran bunga yang lebih besar daripada kerabat diploidnya.

Tabel 3. Contoh pengamatan jumlah kloroplas per pasangan sel penjaga pada tanaman semangka dan pisang.

Tanaman	Asal tanaman	Tingkat ploidi	Σ kloroplas	Referensi
<i>Citrus vulgaris</i>	Kultur pucuk	Diploid	$9,73 \pm 0,46$	Compton <i>et al.</i> (1999)
		Tetraploid	$17,16 \pm 0,65$	
	Plantlet	Diploid	$9,37 \pm 0,49$	
		Tetraploid	$17,10 \pm 0,55$	
Rumah kaca	Diploid	$11,19 \pm 0,58$		
	Tetraploid	$18,71 \pm 0,71$		
<i>Musa sp.</i>	-	Diploid	$10,10 \pm 0,20$	Tenkouano <i>et al.</i> (1998)
		Triploid	$13,10 \pm 0,20$	
		Tetraploid	$15,50 \pm 0,30$	

Tabel 4. Contoh pengamatan luas daun, ukuran bunga dan panjang tangkai bunga pada tanaman *Swainsona formosa* diploid dan tetraploid (Zulkarnain, 2004).

Tingkat ploidi	Luas daun (mm ²)	Panjang mahkota (mm)	Lebar mahkota (mm)	Lebar bendera (mm)	Panjang tangkai bunga (mm)
Diploid	$572,04 \pm 37,91$	$86,07 \pm 0,27$	$32,37 \pm 0,30$	$34,12 \pm 0,32$	$122,30 \pm 1,74$
Tetraploid	$1347,24 \pm 34,61$	$85,96 \pm 0,25$	$37,93 \pm 0,27$	$42,54 \pm 0,29$	$150,38 \pm 1,58$

ANALISIS PLOIDI DENGAN METODA FLOW CYTOMETRY

Persiapan bahan tanaman

Jaringan tanaman yang digunakan dalam analisis *flow cytometry* (FCM) harus bebas dari penyakit dan berbagai stres. Penggunaan daun-daun atau pucuk-pucuk muda biasanya memberikan hasil yang sangat baik (Azhar dan Rusli, 2000a).

Sebanyak 50 – 100 mg daun-daun muda diambil dari tanaman sampel dan dicacah di dalam cawan petri menggunakan pisau skalpel yang bersih dan tajam (Galbraith *et al.*, 1983). Inti

sel dikeluarkan dari sel-sel di dalam jaringan daun yang mengalami perlukaan, langsung ke dalam 2 mL bufer lisis LBO1 yang dilengkapi dengan pewarna fluorochrome 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Pewarna DAPI lebih banyak digunakan daripada pewarna fluorochrome lainnya (misalnya propidion iodida, PI) karena memiliki intensitas dan kekhasan ikatan DNA-DAPI dan relatif lambat pudar (Kapuściński dan Skoczylas, 1977; James dan Jope, 1978; Coleman *et al.*, 1981).

Pewarna DAPI memberikan fluoresensi dan resolusi yang tinggi,

namun pengikatannya spesifik pada wilayah A-T dan tidak cocok untuk digunakan pada analisis genom. Oleh karenanya Azhar dan Rusli (2000a), menganjurkan untuk menggunakan PI karena pewarna fluorochrome ini merefleksikan kandungan DNA total di dalam sel.

Persiapan bufer lisis

Komposisi bufer lisis mempengaruhi efisiensinya untuk menghambat aktifitas enzim nuklease dan mempertahankan integritas inti. Bufer lisis yang paling umum digunakan di dalam analisis FCM adalah LBO1, yang dibuat dengan mencampur 363,4 mg Tris, 148,8 mg Na₂EDTA, 34,8 mg spermine tetrahydrate, 1,193 g KCl, 233,8 g NaCl dan 0,2 mL Triton X-100 di dalam 200 mL air suling pada pH 7,5. Selanjutnya, sebanyak 0,22 mL β-mercaptoethanol ditambahkan pada campuran tersebut sebelum disaring menggunakan saringan nilon berdiameter 0,22 μm. Campuran tersebut dapat disimpan pada suhu -10°C dalam bentuk 10 mL aliquot sebelum digunakan.

Standar

FCM menggunakan standar, baik internal maupun eksternal. Bila menggunakan standar internal, maka inti dari tanaman standar (tingkat ploidi telah diketahui) dan inti dari tanaman sampel diisolasi, diwarnai dan dianalisis secara simultan. Metoda ke-dua menggunakan standar eksternal di mana inti dari tanaman sample diisolasi, diwarnai, dan dianalisis secara individual. Pada kedua metoda tersebut, homogenat inti yang diwarnai disaring menggunakan mesh nilon 50 μm. Tidak ada ketentuan umum mengenai standar yang digunakan. Namun demikian, tanaman yang akan digunakan sebagai standar hendaknya mudah ditumbuhkan dengan keragaman yang rendah dan latar belakang genetiknya diketahui. Akan sangat menguntungkan apabila tanaman standar memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan tanaman sampel.

Kandungan DNA selanjutnya dikuantifikasi menggunakan rasio puncak G1 menggunakan rumus berikut, sehingga tingkat ploidinya dapat ditentukan:

$$2C \text{ kandungan DNA inti (pg)} = \frac{2C \text{ kandungan DNA inti (pg) yang telah diketahui}}{\text{rasio fluoresensi}}$$

di mana C adalah kandungan DNA pada kromosom haploid. Tabel 5 menyajikan kandungan DNA inti dari beberapa spesies tanaman berdasarkan pengukuran menggunakan FCM.

Pada sejumlah tanaman, puncak histogram dapat berubah nomor salurannya sebagai akibat terjadinya degradasi pada sampel yang diuji.

Sehingga, dianjurkan penggunaan standar internal untuk mengeliminir resiko timbulnya *error* sebagai akibat keragaman dalam persiapan sampel dan ketidakstabilan instrumen. Akan tetapi, untuk skrining dalam skala besar, penggunaan standar internal kurang memberikan hasil yang akurat (Azhar dan Rusli, 2000a).

Tabel 5. Kandungan DNA inti pada jaringan daun sejumlah spesies tanaman berdasarkan pengukuran dengan metoda flowcytometry (Galbraith *et al.*, 1983).

Tanaman	Kandungan DNA inti (pg)	KK puncak G1 (%)	Nilai 2C (pg)
<i>Agropyron smithii</i>	0,81	7,3	
<i>Antirrhinum majus</i>	1,03	7,1	3,7
<i>Bouteloua gracilis</i>	39,38	6,4	
<i>Capsicum annum</i>	5,52	4,7	
<i>Catharanthus roseus</i>	4,84	9,7	
<i>Coleus blumei</i>	3,43	6,3	
<i>Elymus canadensis</i>	21,60	4,4	
<i>Euphorbia pulcherima</i>	2,62	10,8	
<i>Helianthus annuus</i>	3,57	6,2	6,3
<i>Ipomoea purpurea</i>	1,08	8,1	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	1,48	6,7	2,0 - 5,1
<i>Nicotiana glauca</i>	6,91	5,7	
<i>Nicotiana glutinosa</i>	4,08	5,9	
<i>Nicotiana knightiana</i>	6,04	6,4	
<i>Nicotiana nesophila</i>	10,15	6,9	9,7
<i>Nicotiana paniculata</i>	5,53	6,4	
<i>Nicotiana paniculata</i> (haploid, dari kultur antera)	2,74	7,1	
<i>Nicotiana sylvestris</i>	5,43	4,8	
<i>Nicotiana sylvestris</i> (haploid, dari kultur antera)	2,74	6,9	
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi	9,67	3,8	
<i>Nicotiana stocktonii</i>	9,45	6,3	
<i>Panicum thermale</i>	2,12	10,8	
<i>Pisum sativum</i>	7,72	5,2	9,8 - 10,5
<i>Solidago canadensis</i>	3,13	7,0	
<i>Solanum melongena</i> var. <i>esculentum</i>	2,33	4,7	
<i>Zea mays</i>	5,99	5,2	4,7 - 11,0

Oleh karena rasio antara standar dan sampel mencerminkan perubahan kandungan DNA, abnormalitas tanaman setelah perubahan tingkat ploidi, misalnya setelah iradiasi, juga dapat diidentifikasi. Misalnya, menurut Azhar *et al.* (2000), ada perbedaan yang signifikan antara tanaman padi varietas MR84 (Mardi Rice 84) dengan galur mutannya. Kandungan DNA inti tanaman mutan lebih tinggi daripada tanaman kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa analisis FCM dapat digunakan

untuk studi keragaman pada induksi mutasi.

Analisis FCM

Presisi analisis FCM dalam memberikan data yang tidak mengambang dan signifikan secara statistik membutuhkan setidaknya-tidaknya 5000 hingga 20000 inti untuk dianalisis. Selain itu, teknik ini juga memiliki tingkat resolusi yang tinggi, dengan Koefisien Keragaman berkisar antara 1 hingga 3%.

Kira-kira 2 mL homogenat inti dianalisis di dalam Cell Counter Analyzer (Model Partec CCA-II) dengan lampu merkuri 100 W (HBO00W/22) sebagai sumber cahaya, pada laju 20 sel per detik. Penting untuk melakukan analisis pada laju yang rendah agar diperoleh resolusi tertinggi.

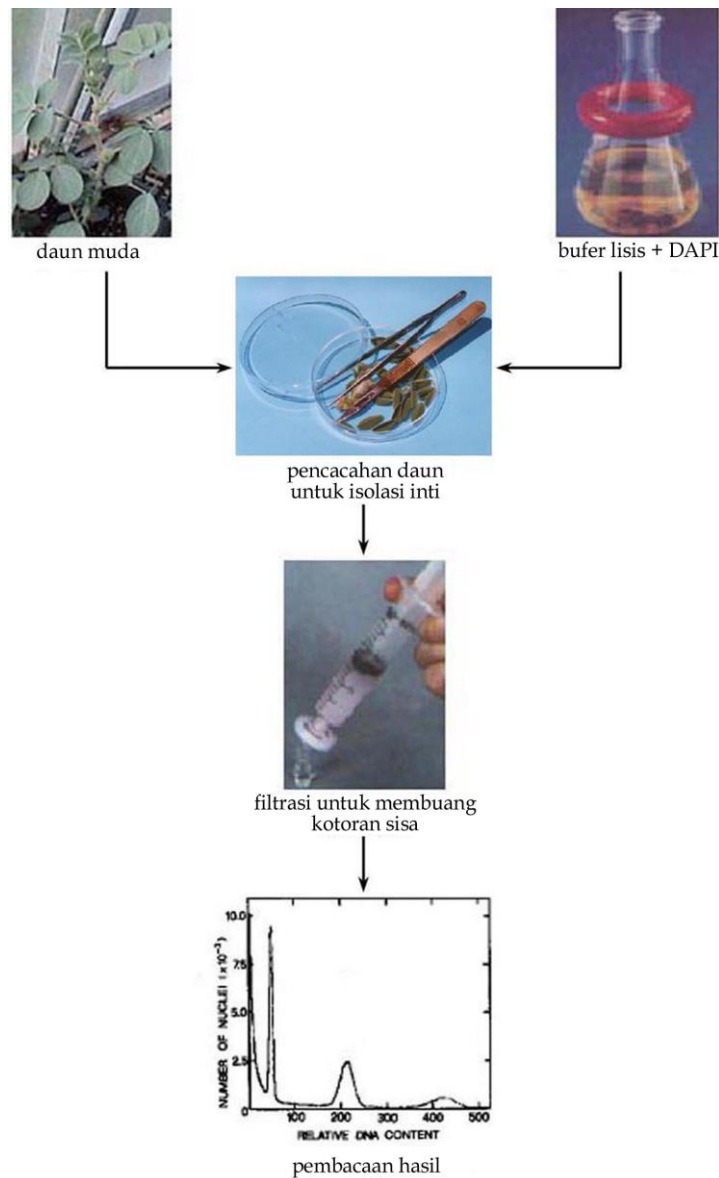
Oleh karena DNA mengikat pewarna fluorescein secara spesifik dan stoikiometrik, untuk analisis FCM menggunakan pewarna DAPI dan pewarna PI menghendaki susunan rangkaian optik yang berbeda. Pewarna DAPI membutuhkan kombinasi filter eksitasi UG1, cermin dichroic TK420 serta okuler GG435 dan GG515 pada eksitasi Ultra Violet. Sementara pewarna PI memerlukan kombinasi filter eksitasi EM520, cermin dichroic TK560 dan TK500 serta okuler RG610 ditambah satu filter emisi RG590 pada eksitasi warna hijau. Pada kedua rangkaian optik ini, digunakan pula filter KG1 dan BG38. Fokus dengan resolusi tinggi dapat diperoleh pada pembesaran 10 x 1,25 dibantu oleh minyak emersi. Pemantulan cahaya oleh inti yang diwarnai keluar sebagai pulsa yang dikonversi menjadi pulsa listrik oleh suatu sensor optik. Sinyal puncaknya sebanding dengan amplitudo maksimum dari pulsa dan sinyal integralnya secara langsung sebanding dengan output cahaya *fluorescent* total dari suatu partikel. Output sinyal analog didigitasi oleh peubah *analog-to-digital* dan disimpan dalam bentuk histogram (Gambar 1).

KAJIAN KEDUA METODA

Penentuan ploidi tanaman secara tradisional adalah dengan menghitung

jumlah kromosom secara langsung (Hamill *et al.*, 1992; Osuji *et al.*, 1996; Zulkarnain *et al.*, 2002) dengan bantuan berbagai metoda pewarnaan, seperti aceto-carmine, aseto-orcein atau teknik Feulgen. Meskipun metoda ini dapat menghitung jumlah kromosom secara tepat, dan bahkan hasilnya dapat digunakan untuk analisis karyotipe, namun tidak dapat diandalkan untuk skrining skala besar (Tenkouano *et al.*, 1998). Selain itu, dalam beberapa hal, teknik *root tip squash* pada beberapa spesies tanaman tidak praktis karena kecilnya ukuran kromosom, seperti pada *Atriplex bellardierei* (de-Lange, 1996) dan *Swainsona formosa* (Zulkarnain *et al.*, 2002). Di samping itu, baik metoda siapan ujung akar maupun siapan antera sangat tergantung pada penentuan tahap pembelahan sel yang tepat agar kromosom dapat terlihat dengan jelas. Tahap yang paling baik adalah metafase, di mana kromosom tersebar secara individual dan terpisah satu sama lain (Ohkawa dan Yokota, 1998).

Walaupun metoda siapan antera relatif lebih sederhana dan lebih mudah daripada metoda siapan ujung akar, metoda ini dihadapkan pada kendala lamanya waktu yang diperlukan sampai tersedianya antera yang memenuhi syarat untuk tujuan analisis. Setidak-tidaknya seorang peneliti harus menunggu sampai tanaman memasuki fase pertumbuhan reproduktif untuk mendapatkan bahan antera yang diperlukan. Pada tanaman yang pembungaannya musiman, seperti tanaman buah-buahan tropis, seorang peneliti harus menunggu setidak-tidaknya satu tahun. Bahkan pada tanaman bambu yang bersifat monokarpik, kita harus menunggu setidak-tidaknya 12 hingga 24 tahun untuk mendapatkan mikrosporanya (Taji *et al.*, 2002).



Gambar 1. Skema protokol analisis FCM untuk penentuan tingkat ploidi (Zulkarnain, 2003).

Metoda lain yang cukup dapat diandalkan adalah dengan mengamati parameter-parameter seperti karakteristik stomata, jumlah klorofil di dalam sel penjaga, serta ukuran dan viabilitas serbuk sari. Metoda ini relatif mudah dan sederhana, namun tidak dapat digunakan untuk menentukan tingkat ploidi secara kuantitatif (jumlah

kromosom). Lagi pula parameter ini tidak sepenuhnya berlaku universal untuk semua spesies tanaman. Pada sejumlah tanaman terdapat perbedaan yang signifikan dalam ukuran dan kerapatan stoma antara individu diploid dan tetraploid, misalnya pada tanaman jahe (Hamill dan Smith, 2002) dan *Swainsona formosa* (Zulkarnain, 2004),

individu tetraploid memiliki stomata yang lebih besar dengan kerapatan lebih rendah daripada individu diploid. Namun demikian, parameter ini tidak dapat diandalkan untuk penentuan tingkat ploidi pada tanaman pisang (Vandenhout *et al.*, 1995).

KESIMPULAN

Metoda siapan ujung akar dan siapan antera adalah cara yang paling dapat diandalkan untuk menentukan tingkat ploidi tanaman secara akurat, sekaligus mempelajari karyotipe kromosomnya. Akan tetapi, untuk penentuan ploidi dalam skala besar cara ini tidak efisien dan tidak ekonomis.

Metoda lain adalah dengan mempelajari morfologi (seperti ukuran tanaman, luas daun, ketebalan daun, ukuran bunga, dan panjang tangkai bunga) dan karakteristik anatomi tanaman (seperti ukuran dan kerapatan stomata, jumlah klorofil pada sel penjaga, serta ukuran dan viabilitas serbuk sari). Namun cara ini juga dinilai tidak efektif untuk pekerjaan skala besar. Lagipula, informasi ploidi yang diperoleh hanya bersifat kualitatif, dan tidak dapat mengetahui karakteristik kromosom secara detail.

Walaupun analisis FCM tidak dapat digunakan untuk menentukan tingkat ploidi tanaman berdasarkan jumlah kromosomnya, metoda FCM sangat efektif untuk analisis ploidi tanaman dalam skala besar. Metoda analisis ini sederhana, cepat, dan memungkinkan untuk menganalisis ribuan tanaman dalam waktu singkat. Dewasa ini metoda FCM telah memberikan kontribusi nyata bagi analisis DNA tanaman tingkat tinggi. Oleh karenanya

analisis FCM diperkirakan akan menjadi alat analisis ploidi tanaman yang makin penting pada masa mendatang. Analisis FCM sangat potensial dalam indentifikasi dini tanaman yang memiliki genom yang tidak stabil (aneuploid, poliploid) yang diregenerasikan dari kultur jaringan, dan dengan bantuan teknik ini tingkat keseragaman serta kualitas agronomi tanaman akan dapat diperbaiki.

DAFTAR PUSTAKA

- Azhar, M., A. H. Rahim, A. Saad dan D. Kamarudin. 2000. Variation in rice mutant lines of MR84 variety after Gamma irradiation. *Prosiding Biotechnology National Seminar*. Lumut, Perak, Malaysia.
- Azhar, M. dan I. Rusli. 2000a. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Prosiding Malaysian Institute for Nuclear Technology Research and Development Seminar*. Selangor: 19-25.
- Azhar, M. dan I. Rusli. 2000b. Optimising flow cytometric analysis for nuclear DNA in *Musa* spp. *Tropical Plant Biology Research in Malaysia: Fruit and Vegetables* 9: 345-349.
- Borrino, E. M. dan W. Powell. 1988. Stomatal guard cell length as an indicator of ploidy in microspore-derived plants of barley. *Genome* 30: 158-160.
- Coleman, A. W., M. J. Maguire dan J. R. Coleman. 1981. Mithramycin and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids and

- virus particles. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29: 959-968.
- Compton, M. E., N. Barnett dan D. J. Gray. 1999. Use of fluorescein diacetate (FDA) to determine ploidy of *in vitro* watermelon shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 199-203.
- Cramer, C. S. 1999. Laboratory techniques for determining ploidy in plants. *HortTechnology* 9: 594-596.
- Darlington, C. D. dan L. F. LaCour. 1976. The Handling of Chromosomes (6th edition). Willey, New York.
- de-Lange, P. J. 1996. Chromosome number of New Zealand specimens of *Atriplex billardi*, Chenopodiaceae. *New Zealand Journal of Botany* 35.
- Dickson, E. E., K. Arumuganathan, S. Kresovich dan J. J. Doyle. 1992. Nuclear DNA content variation within the Rosaceae. *American Journal of Botany* 79: 1081-1086.
- Esau, K. 1965. Plant anatomy (2nd edition). John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma dan E. Firoozabady. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- Hamill, S. dan M. Smith. 2002. *In Vitro* Induction and Field Selection of Stable Autotetraploid Ginger Variety. *Dalam* A. Taji dan R. Williams [eds.], *The Important of Plant Tissue Culture and Biotechnology in Plant Sciences*, 171-178. University of New England, Armidale.
- Hamill, S. D., M. K. Smith dan W. W. Dodd. 1992. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Australian Journal of Botany* 40: 887-896.
- James, T. W. dan C. Jope. 1978. Visualisation by fluorescence of chloroplast DNA in higher plants by means of DNA-specific probe 4',6-diamidino-2-phenylindole. *Journal of Cellular Biology* 79: 623-630.
- Kapuscinski, J. dan B. Skoczylas. 1977. Simple and rapid fluorometric method for DNA microassay. *Annals of Biochemistry* 83: 252-257.
- Lin, S., H.-C. Lee, W.-H. Chen, C.-C. Chen, Y.-Y. Kao, Y.-M. Fu, Y.-H. Chen dan T.-Y. Lin. 2001. Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. and *Dorotis pulcherima*. *Journal of American Society for Horticultural Science* 126: 195-199.
- Ohkawa, T. dan M. Yokota. 1998. Chromosome numbers and their variation patterns of *Carex* in the Ryukyu Islands. *Cytologia* 63: 447-457.
- Osuji, J. O., B. E. Okoli dan R. Ortiz. 1996. An improve procedure for mitotic studies of the *Eumusa* section of the genus *Musa* L. (Musaceae). *Infomusa* 5: 12-14.
- Prakash, N. 2000. Methods in Plant Microtechnique. University of New England, Armidale, Australia.
- Sgorbati, S., M. Levi, E. Sparvoli, F. Trezzi dan G. Lucchini. 1986. Cytometry and flow cytometry of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained suspension of nuclei released from fresh and fixed tissue of plants. *Physiologia Plantarum* 68: 471-476.
- Sharma, A. K. dan A. Sharma. 1980. Chromosome Techniques: Theory and Practice (3rd edition). Butterworths, London.
- Singsit, C. dan P. Ozias-Akins. 1992. Rapid estimation of ploidy levels in *in*

- in vitro*-regenerated interspecific *Arachis* hybrids and fertile triploids. *Euphytica* 64: 183-188.
- Singsit, C. dan R. E. Veilleux. 1991. Chloroplast density in guard cells of leaves of anther-derived potato plants grown *in vitro* and *in vivo*. *HortScience* 26: 592-594.
- Taji, A., P. Kumar dan P. Lakshmanan. 2002. *In Vitro Plant Breeding*. Haworth Press, Inc., New York.
- Tan, G.-Y. dan G. M. Dunn. 1973. Relationship of stomatal length and frequency and pollen-grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss. *Crop Science* 13: 332-334.
- Tenkouano, A., J. H. Crouch, H. K. Crouch dan D. Vuylsteke. 1998. Ploidy determination in *Musa* germplasm using pollen and chloroplast characteristics. *HortScience* 33: 889-890.
- Thao, B. T. P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki dan H. Okubo. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 19-25.
- Tosca, A., R. Pandolfi, S. Citterio, A. Fasoli dan S. Sgorbati. 1995. Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of gerbera. *Plant Cell Reports* 14: 455-458.
- Vandenhout, H., R. Ortiz, D. Vuylsteke, R. Swennen dan K. V. Bai. 1995. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. *Euphytica* 83: 117-122.
- Vaughan, M. A. dan K. C. Vaughn. 1998. Mitotic disrupters from higher plants and their potential uses as herbicides. *Weed Technology* 2: 533-539.
- Zonneveld, B. J. M. dan F. V. Iren. 2000. Flow cytometric analysis of DNA content in *Hosta* reveals ploidy chimeras. *Euphytica* 111: 105-110.
- Zulkarnain. 2003. Breeding Strategies in Sturt's Desert Pea, *Swainsona formosa* (G. Don) J. Thompson, Using *In Vitro* and *In Vivo* Techniques. *Tesis PhD*, University of New England, Armidale.
- Zulkarnain. 2004. Comparison of diploid *Swainsona formosa* and their tetraploid relatives obtained from oryzalin treatment. *Hayati* 11: 6-10.
- Zulkarnain, Z., A. Taji dan N. Prakash. 2002. Chromosome number in *Swainsona formosa* (Fabaceae). *New Zealand Journal of Botany* 40: 331-333.