

Induksi Mutasi Kromosom dengan Kolkisin pada Tanaman Anggur Merah (*Vitis vinifera* L. Varietas Prabu Bestari) Melalui Pembentukan Kalus Secara *In Vitro*

DIMINDA ELA SRI ERTINA BR GINTING
MADE SRITAMIN*)
WAYAN ADIARTAYASA

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana
Jl. P.B. Sudirman Denpasar Bali 80231
*)Email: madesritamin@gmail.com

ABSTRACT

Induction of Chromosome Mutations with Colchicin in Red Grape (*Vitis vinifera* L. Prabu Bestari Varieties) Through In Vitro Callus Formation

This study aims to determine the colchicine concentration that can induce chromosome mutations in red grape, carried out in vitro. This study used a completely randomized design (CRD) with 9 treatments and 3 replications so that the number of experimental units was 27 bottles of culture. The sterilized red grape node explants were immersed in colchicine at the concentration according to the treatment for 24 hours. The colchicine concentration used was 0.015% (K1), 0.020% (K2), 0.025% (K3), 0.030% (K4), 0.035% (K5), 0.040% (K6), 0.045% (K7), 0.050% (K8) and 0% (K0) as controls. The effect of immersion in several colchicine concentrations on chromosome mutations in explants of red grape nodes that form callus cannot be observed because the chromosomes are not clearly visible, and the number of chromosomes cannot be calculated. Callus was formed in colchicine immersion treatment with a concentration of 0.015% (K1) and 0.035% (K5). Callus on K5 was formed faster, namely 10 weeks after planting, while K1 was at 11 weeks after planting. The average callus diameter on K5 was larger with a size of 4.3 mm, while on K1 it was 2 mm.

Keywords: Chromosome mutation, In Vitro, Colchicine

1. Pendahuluan

Anggur merah (*Vitis vinifera* L.) merupakan buah yang mengandung zat-zat yang bermanfaat bagi tubuh seperti vitamin, mineral, *flavonoid*, *resveratrol*, *proantosianidin* dan *prosiaanidin*. Beberapa penelitian menunjukkan adanya pengaruh konsumsi anggur merah (*Vitis vinifera* L.) terhadap penurunan risiko morbiditas dan mortalitas penyakit kardiovaskular (Vermithia *et al.*, 2018). Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keunggulan untuk budidaya anggur, dimana anggur dapat dipanen 3 kali setahun sementara di daerah subtropis hanya bisa dipanen sekali

setahun. Meski demikian, Indonesia hanya dapat menghasilkan sekitar 10 ton per hektar per tahun sedangkan pada negara subtropis hasil optimal anggur bisa mencapai 20 ton per hektar per tahun. Hal ini terjadi karena belum banyak anggur hasil perkebunan dalam negeri yang bisa menyaingi kualitas anggur impor (Laily, 2020). Dengan potensi alam Indonesia, produksi anggur dapat semakin meningkat dengan melakukan pemberdayaan varietas unggul.

Kultivar-kultivar unggul dapat diperoleh melalui pemuliaan tanaman, diantaranya dengan induksi mutasi. Mutasi adalah perubahan yang terjadi secara tiba-tiba dan acak pada materi genetik. Mutagen atau alat mutasi artifisial dibedakan atas dua kelompok, yaitu mutagen fisik dan mutagen kimia (Asadi, 2013). Mutasi buatan salah satunya dengan menggunakan zat mutagen kimiawi yang pada umumnya menggunakan senyawa kolkisin. Kolkisin dapat menyebabkan terjadinya duplikasi pada kromosom yang mengakibatkan perubahan genetik (Nurwanti, 2010).

Kultur jaringan tanaman adalah suatu teknik untuk menumbuhkan sel, jaringan ataupun irisan organ tanaman di laboratorium pada suatu media buatan yang mengandung nutrisi yang aseptik (steril) untuk menjadi tanaman secara utuh (Dwiyani, 2015). Salah satu faktor penentu keberhasilan dalam melakukan kultur jaringan adalah jenis dan dosis zat pengatur tumbuh yang digunakan. *Benzylamino Purin* (BAP) adalah salah satu sitokinin yang sudah banyak digunakan untuk kultur jaringan yang berperan dalam mengatur pembelahan sel, memacu morfogenesis dan perkembangan kloroplas serta menginduksi embriogenesis dan organogenesis dan harga yang relative murah. Berdasarkan hasil penelitian Cerianingsih, *et al* (2012) penambahan 2 mg/L BAP mampu menghasilkan persentase tunas tertinggi pada eksplan tunas aksilar anggur Varietas Jestro Ag 86 dan Prabu Bestari.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ermayanti, *et al.* (2018) perlakuan perendaman tunas *in vitro* dengan larutan kolkisin konsentrasi 0.05% selama 1 hari sudah mampu menginduksi poliploidisasi pada talas Kaliurang yang telah dikonfirmasi dengan flositometer dan penghitungan kromosom. Induksi poliploid dengan kolkisin terhadap tanaman anggur merah (*Vitis vinifera* L.) Varietas prabu Bestari belum pernah dilakukan. Melalui penelitian ini diharapkan akan menghasilkan tanaman anggur merah yang memiliki produktifitas tinggi sehingga lebih unggul dibandingkan dengan tanaman anggur merah diploid.

2. Bahan dan Metode

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Juli 2020 sampai dengan Januari 2021 bertempat di UPT Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler Universitas Udayana, di Jalan P.B. Sudirman, Denpasar.

2.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan berupa buku (nodus) tanaman anggur merah (*Vitis vinifera* L. Var. Prabu Bestari) yang dibudidayakan di

Kebun Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Udayana, media dasar Murashige & Skoog (MS), agar, zat pengatur tumbuh (ZPT) BAP dan NAA, akuades, Kolkisin yang diproduksi oleh Biotech Agro Indonesia, alkohol 70%, fungisida, tween 20, HgCl₂ 0,05%, klorox 10 dan 20% dan detergen. Alat-alat yang digunakan adalah botol kultur, pisau, gunting, pinset, gelas ukur, cawan petri, kertas saring, autoklaf, neraca analitik, microwave, shaker, hand sprayer, bunsen, aluminium foil, tisu, kertas label, laminar air flow (LAF), spiritus, botol lampu bunsen dan inkubator. Untuk pengamatan jumlah kromosom menggunakan pewarna HCL dan pewarna safranin 2%, kaca preparat dan cover glass.

2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari sembilan perlakuan dengan tiga ulangan pada tiap perlakuan sehingga jumlah unit percobaan sebanyak 27 botol kultur dengan 2 eksplan disetiap botol kultur. Konsentrasi kolkisin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,015% (K1), 0,020% (K2), 0,025% (K3), 0,030% (K4), 0,035% (K5), 0,040% (K6), 0,045% (K7), 0,050% (K8) dengan kontrol 0% (K0).

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan seperti cawan petri, botol kultur, pisau dan pinset dicuci dengan sabun cair dan dibilas dengan air mengalir, dikeringkan dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 17,5 psi selama 60 menit.

2.4.2 Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS, pada media tersebut ditambahkan zat pengatur tumbuh 2 ppm BAP dan 1 ppm NAA ke dalam media dimasukkan agar 8 gr/l dan gula 30 gr/l, lalu dipanaskan hingga larutan menjadi bening. Kemudian media diautoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 17,5 psi selama 60 menit. Di dalam laminar, media yang sudah diautoklaf dituangkan ke dalam botol kultur steril sebanyak 20 ml setiap botol. Botol kultur disimpan di inkubator hingga media menjadi padat dan siap untuk digunakan.

2.4.3 Sterilisasi Eksplan

Sebelum eksplan digunakan, dilakukan pemeliharaan tanaman induk dengan menyemprotkan fungisida 2 g/l satu kali dalam seminggu. Tunas anggur dibersihkan dari daun dan sulur. Eksplan nodus tanaman anggur merah dicuci menggunakan detergen selama 5 menit lalu bilas menggunakan air mengalir. Eksplan yang sudah dicuci direndam dalam larutan fungisida 2 g/l, dishaker selama 10 menit lalu dibilas menggunakan air mengalir, kemudian direndam lagi di dalam larutan fungisida 2 g/l, dishaker selama 10 menit lalu bilas menggunakan aquadest sebanyak 3 kali. Di dalam Laminar, eksplan dicelupkan dalam alkohol 70% selama 30 detik, lalu dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali, kemudian direndam dalam larutan HgCl₂ 0,05% selama satu

menit lalu bilas menggunakan aquades sebanyak 3 kali. Eksplan direndam dalam larutan Clorox berturut-turut 20% dan 10% yang ditambah dengan 2 tetes tween 20 selama 5 menit, kemudian bilas menggunakan aquades sebanyak 3 kali. Setelah proses sterilisasi, eksplan dipotong di dalam cawan petri berisi 10 ml aquades ditambah 3 tetes *povidone-iodine* (betadine) dengan ukuran sekitar 0,5-1 cm setelah dipotong, eksplan dicelupkan dalam vitamin C 10 g/l selama 3 menit.

2.4.4 Media Perendaman Eksplan

Perendaman eksplan dengan media cair yaitu MS ditambah kolkisin sesuai perlakuan selama 1 hari (24 jam). Eksplan direndam sesuai perlakuan di dalam cawan petri lalu di simpan di dalam incubator. Setelah perendaman, eksplan dicuci dengan aquades steril sebanyak 3 kali, kemudian ditanam ke media perbanyak tanam yang sudah dipersiapkan.

2.4.5 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam laminar air flow. Botol-botol berisi media yang sudah disterilkan. Di dalam laminar air flow disediakan 1 lampu bunsen untuk mencegah kontaminasi. Tutup botol dibuka lalu bagian sekitar mulut botol dilewatkan di atas api bunsen untuk memperkecil kontaminasi. Eksplan yang telah disterilkan, diambil dari dalam cawan petri dan dimasukkan ke dalam botol kultur dengan menggunakan pinset steril.

2.4.6 Pemeliharaan Kultur

Eksplan yang telah ditanam di dalam botol kultur diletakkan pada rak pemeliharaan dengan kondisi ruangan yang steril, suhu berkisar antara 25 °C. Botol-botol yang berisi eksplan tersebut disusun dengan rapi sehingga memudahkan dalam pengamatan. Ruangan diupayakan dalam keadaan steril dengan menyemprotkan alkohol 70% setiap harinya sampai eksplan membentuk kalus.

2.4.7 Uji Sitologi

Analisis jumlah kromosom dilakukan dengan menggunakan metode squash. Squashing (sediaan tekan) digunakan untuk komponen sel suatu jaringan. Sample yang diamati kromosomnya sebanyak satu sample setiap perlakuan. Potongan kalus diambil dari botol kultur menggunakan pinset dan dimasukkan ke larutan 1 N HCl dan direndam di air hangat pada suhu 60 °C selama dua menit. Potongan kalus diangkat, kemudian direndam ke dalam pewarna Safranin 2% selama 10 menit. Kalus dimasukkan ke dalam gelas objek yang telah ditetesi pewarna safranin 2%, kemudian ditutup dengan cover glass dan ditekan dengan jari atau dipukul perlahan hingga kalus pipih dengan menggunakan pangkal pensil berkaret. Gelas objek dipanaskan dengan cara melewatkan di atas api. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop.

2.5 Variabel dan Analisis Data

Variabel yang diamati adalah:

1. Persentase eksplan membentuk kalus.

Persentase eksplan membentuk kalus ditentukan dengan menghitung ratio jumlah eksplan yang membentuk kalus dengan seluruh eksplan yang ditanam.

2. Waktu terbentuknya kalus (Minggu Setelah Tanam).

Waktu terbentuknya kalus ditentukan berdasarkan jarak waktu (hari) sejak penanaman hingga mulai terbentuknya kalus dari tiap perlakuan.

3. Morfologi kalus.

Pengamatan morfologi kalus dilakukan pada 12 minggu setelah tanam (pengamatan terakhir). Morfologi kalus yang diamati adalah warna, tekstur dan diameter kalus. Warna kalus diamati secara visual dengan ciri warna bening, putih, hingga kehijauan. Tekstur kalus diamati dengan cara memecah kalus, untuk melihat ikatan antar sel yang kuat atau mudah terpisah. Pengukuran diameter kalus dilakukan dengan menempelkan penggaris pada luar botol dan menghitung diameter terpanjang kalus.

4. Tingkat Ploidi.

Pengamatan tingkat ploidi dilakukan dengan menghitung jumlah kromosom pada kalus menggunakan metode quashing (sediaan tekan). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Analisis data yang digunakan adalah dengan analisis varians (*analysis of variance*, ANOVA) untuk mengetahui signifikansi perbedaan rata-rata antara kelompok sampel yang satu dengan yang lain menggunakan uji *Duncan's* 5%. Oleh karena banyak data hilang akibat belum tumbuh dan matinya eksplan, maka data pengamatan yang diperoleh hanya ditabulasi dan dicari rata-ratanya kemudian dibahas secara deskriptif.

3. Hasil dan Pembahasan

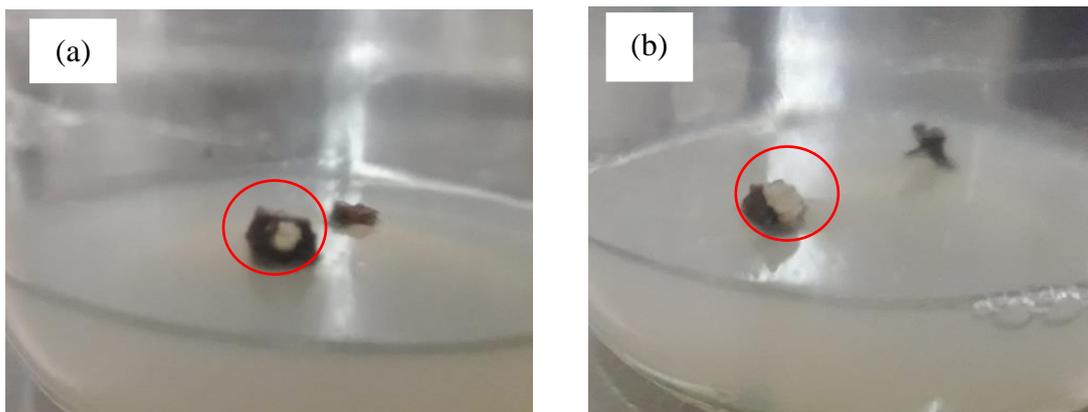
3.1 Pengaruh Konsentrasi Kolkisin Terhadap Pembentukan Kalus

Berdasarkan hasil penelitian, eksplan nodus tanaman anggur merah yang ditanam pada media MS dengan menambahkan zpt BAP 2 ppm dan NAA 1 ppm dapat membentuk kalus pada K1 (0,015%) dan K5 (0,035%). Persentase rata-rata eksplan membentuk kalus pada K1 dan K5 masing-masing sebesar 16,67% sedangkan pada perlakuan lainnya belum menunjukkan pembentukan kalus (Tabel 1). Eksplan yang belum menunjukkan pembentukan kalus masih terlihat segar hingga pengamatan terakhir pada 12 minggu setelah tanam, eksplan masih berwarna hijau.

Tabel 1. Persentase eksplan membentuk kalus

Perlakuan	Ulangan (%)			Jumlah	Rata-Rata
	I	II	III		
K0 (kontrol)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K1 (0,015%)	0,00	50,00	0,00	50,00	16,67
K2 (0,020%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K3 (0,025%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K4 (0,030%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K5 (0,035%)	50,00	0,00	0,00	50,00	16,67
K6 (0,040%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K7 (0,045%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K8 (0,050%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
JUMLAH	50,00	50,00	0,00	100,00	

Waktu terbentuknya kalus pada K5 lebih cepat yaitu 10 minggu setelah tanam (mst) sedangkan K1 pada 11 mst. Rata-rata diameter kalus pada K5 lebih besar dibandingkan K1 dimana rata-rata diameter pada K5 adalah 4,33 mm sedangkan pada K1 sebesar 2 mm (Tabel 2). Berdasarkan hasil pengamatan kalus pada perlakuan K1 berwarna putih terang sedangkan pada K5 kalus berwarna putih jernih. Kalus pada perlakuan K1 dan K5 memiliki tekstur remah, dimana ikatan antar selnya terlihat renggang dan saat dilakukan pengambilan menggunakan pinset kalus mudah terpisah dan pecah (Gambar 1).



Gambar 1. Kalus yang terbentuk pada perlakuan (a) K1 (0,015%) (b) K5 (0,035%). Lingkaran merah menunjukkan kalus yang terbentuk

Tabel 2. Rata-rata diameter kalus

Perlakuan	Diameter Kalus (mm)			Rata-Rata
	10 mst	11	12	
		mst	mst	
K1 (0,015%)	0	2	4	2,00
K5 (0,035%)	3	4	6	4,33

Ada beberapa faktor yang menyebabkan tidak terjadi atau gagalnya proses organogenesis pada tanaman dalam kultur jaringan, salah satunya adalah sel-sel pada eksplan yang tidak mampu berdiferensiasi karena kurangnya rangsangan dari zat pengatur tumbuh yang tidak tepat jenis atau dosis yang diberikan pada media kultur jaringan (Tripepi, 1997). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Wardhani *et.al* (2011) menyatakan bahwa perlakuan konsentrasi kolkisin yang tinggi menunjukkan persentase eksplan berkalus yang lebih rendah namun masih lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Kolkisin bekerja dengan cara menghambat pembentukan benang-benang gelendong yang menghentikan proses mitosis pada stadium metafase yang mengakibatkan penundaan pertumbuhan karena jaringan yang rusak memerlukan waktu yang lama untuk tumbuh. Faktor yang sangat berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan eksplan dalam kultur jaringan adalah kontaminasi oleh mikroorganisme (Dwiyani, 2015).

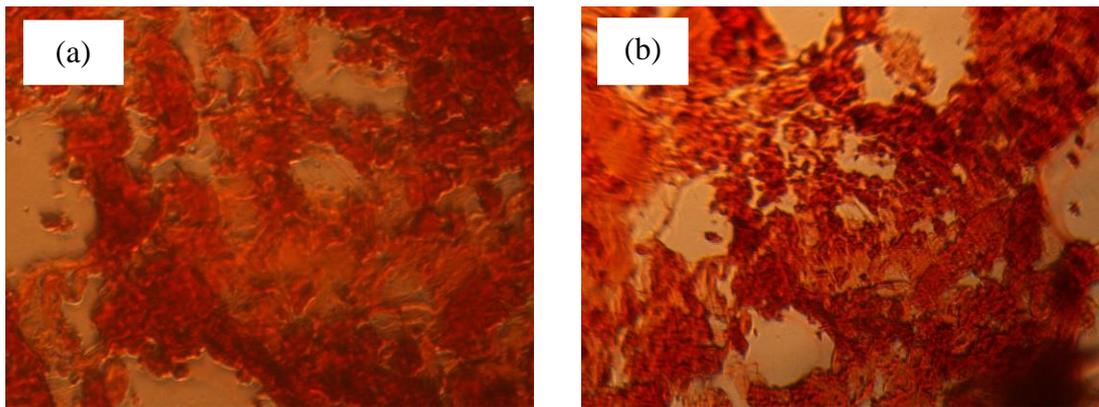
Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, kontaminasi pada eksplan terlihat sejak 3 hari setelah tanam. Pada 3 hari setelah tanam (hst) terlihat 3 eksplan yang terkontaminasi oleh jamur dan tidak ada yang terkontaminasi oleh bakteri. Kontaminasi oleh bakteri terlihat pada 4 hst sebanyak 3 eksplan. Pada hari ke 5 dan 6 setelah tanam tidak terlihat penambahan eksplan yang terkontaminasi oleh jamur dan bakteri. Hari ke 7 setelah tanam eksplan yang terkontaminasi oleh jamur bertambah sebanyak 9 eksplan sehingga total eksplan yang terkontaminasi oleh jamur sebanyak 12 eksplan. Setelah hari ke 7 tidak terlihat lagi penambahan jumlah eksplan yang terkontaminasi oleh jamur dan bakteri hingga pengamatan terakhir dilakukan. (Tabel 3.).

Tabel 3. Waktu dan jumlah kontaminasi oleh jamur dan bakteri pada eksplan

Waktu (HST)	Jumlah	
	Jamur	Bakteri
3	3	-
4	-	3
5	-	-
6	-	-
7	9	-
Jumlah	12	3

3.2 Pengaruh Konsentrasi Kolkisin Terhadap Mikroskopis Kalus

Pengamatan mikroskopis yang dilakukan pada kalus tanaman anggur merah (*Vitis vinifera* L. Varietas Prabu Bestari) pada perlakuan K1 (0,015%) dan K5 (0,035%) menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x, tidak dapat menunjukkan kromosom dengan jelas (Gambar 2). Pada preparat kalus yang diamati tidak dapat memperlihatkan kromosom dengan jelas sehingga sulit untuk melakukan penghitungan dan perbandingan jumlah kromosom pada perlakuan K1 dan K5.



Gambar 2. Pengamatan Mikroskopis kalus (a) perlakuan K1, (b) perlakuan K5

Penelitian yang dilakukan oleh Winarto (2011), mendapatkan hasil bahwa pewarnaan kromosom dengan kalus sebagai sumber eksplan tidak menghasilkan pewarnaan yang jelas sedangkan pada sel-sel yang sedang mengalami pembelahan mitosis, kromosom hanya terlihat berupa titik-titik ungu yang menyebar dalam sel yang diduga merupakan kromosom yang memendek hal ini menyebabkan penghitungan jumlah kromosom sulit dilakukan. Keberhasilan pewarnaan kromosom dapat dipengaruhi oleh pemilihan eksplan/donor uji kromosom proses pra perlakuan, dan pelaksanaan pengamatannya (Fukui *et al.*, 1996).

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan kesimpulan yaitu pengaruh perendaman beberapa konsentrasi kolkisin terhadap mutasi kromosom pada eksplan nodus tanaman anggur merah yang membentuk kalus belum dapat diamati karena kromosom tidak terlihat dengan jelas dan tidak dapat dilakukan penghitungan jumlah kromosom. Eksplan membentuk kalus pada perlakuan perendaman kolkisin dengan konsentrasi 0,015% (K1) dan 0,035% (K5). Kalus pada K5 terbentuk lebih cepat yaitu 10 minggu setelah tanam sedangkan K1 pada 11 minggu setelah tanam. Rata-rata diameter kalus pada K5 lebih besar dengan ukuran 4,3 mm sedangkan pada K1 berukuran 2 mm.

Daftar Pustaka

- Asadi. 2013. Pemuliaan Mutasi untuk Perbaikan terhadap Umur dan Produktivitas pada Kedelai . *Jurnal AgroBiogen* 135-142.
- Cerianingsih, M. W., I. A. Astarini dan G. M. Nurjaya. 2012. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh IBA dan BAP pada Kultur in Vitro Tunas Aksiler Anggur (*Vitis vinifera* L.) Varietas Prabu Bestari dan Jestro AG 86." *Jurnal of Biological Sciences* 2 (1): 2302-5697.
- Dwiyani, R. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman*. Denpasar: Pelawa Sari .

- Ermayanti, T. M., A. N. Wijayanta dan D. Ratnadewi. 2018. Induksi Poliploid pada Tanaman Talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) Kultivar. *Jurnal Biologi Indonesia* 1 (14): 91-102.
- Fukui, K. dan S. Nakayama. 1996. *Plant Chromosomes Laboratory Methods*. Boca Raton: CRC Press.
- Laily, R. N. 2020. *Mengenal Anggur Prabu Bestari, Buah Asal Australia yang Dibudidayakan di Probolinggo*. Jawa Timur: Merdeka.com.
- Nurwanti, L. 2010. Induksi Mutasi Kromosom dengan Kolkisin pada Anthurium Wave of Love (*Anthurium plowmanii* Croat.) Secara In Vitro. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Tripepi, R. R. 1997. Adventitious shoot regeneratoin. In R.R.I. Gereve Biotechnology of ornaments plants. *USA.CAB. Internasional* 112-121.
- Vermitia, dan A. J. Wulan. 2018. Potensi Anggur Merah (*Vitis vinifera*) sebagai Pencegahan Aterosklerosis. *Agromedicine* 5 (1): 458-42.
- Wardhani, M. dan N. M. A. Wiendi. 2011. Induksi Mutasi Genetik Melalui Penggandaan Kromosom Kedelai (*Glycine Max* L. Merr) Varietas Wilis dan Tanggamus dengan Kolkisin Secara In Vitro. Bogor: Prosiding Simposium dan Seminar Bersama.
- Winarto, B. 2011. Pewarnaan Kromosom dan Pemanfaatannya dalam Penentuan Tingkat Ploidi Eksplan Hasil Kultur Anter Anthurium . *J. Hort* 21 (2): 113-123.