

**KERUSAKANKROMOSOM BAWANG MERAH (*Allium cepa*L.) AKIBAT
PERENDAMAN DENGAN ETIDIUM BROMIDA**

**CHROMOSOMESDAMAGEOF ONION(*Allium cepa* L.)AFTER SUBMERSION IN
ETHIDIUM BROMIDE**

Eka Fibayani Imaniar, Made Pharmawati

*Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran
email: pharmawati@hotmail.com*

INTISARI

Penelitian ini bertujuan melihat kerusakan kromosom bawang merah(*Allium cepa* L.) yang ditimbulkan oleh etidium bromida pada perendaman 6 dan 12 jam dengan konsentrasi 500 ppm. Metode penelitian yang digunakan untuk melihat kerusakan kromosom adalah teknik *squash* pada ujung akar bawang merah. Pada hasil penelitian ditemukan beberapa jenis kerusakan kromosom bawang merah setelah perendaman dengan etidium bromida, antara lain kromosom tampak terpotong-potong, terbentuk mikronuklei, 'tunas' nukleus dan jembatan kromosom. Pada perendaman 6 jam didapat persentase kerusakan kromosom rata-rata sebesar 2,99%, sedangkan pada perendaman selama 12 jam didapat persentase kerusakan kromosom rata-rata sebesar 6,81%.

Kata kunci : *Etidium bromida, kerusakan kromosom, Allium cepa L.*

ABSTRACT

The aim of this research was to identify the damage of onion's(*Allium cepa*L.) chromosomes caused by ethidium bromide submersion for 6 and 12 hours at 500 ppm. The method used to study chromosome damage of onion root tip was squash technique. The result showed several types of chromosome damages such as the formation of, micronuclei, nuclear buds and chromosome bridges. At 6 hours submersion, the average percentage of chromosomal damage was 2.99 %, while in submersion for 12 hours, the average percentage of chromosomal damage was 6.81 %.

Keywords: *Ethidium bromide, chromosome damage, Allium cepa L.*

PENDAHULUAN

Etidium bromida merupakan senyawa yang digunakan untuk analisis DNA yaitu untuk memvisualisasi potongan-potongan DNA pada gel elektroforesis. Etidium bromida merupakan molekul yang mengikat kuat pada DNA yang dikenal dengan agen interkalat karena mengkalat pada susunan DNA yang kokoh. Oleh

sebab itu, etidium bromida dapat merusak pilin ganda dan menghambat replikasi DNA, transkripsi, perbaikan DNA, rekombinasi dan menyebabkan aberasi kromosom (Reha *et al.*, 2003). Aberasi kromosom adalah perubahan jumlah kromosom dan susunan atau urutan gen dalam kromosom yang terjadi akibat faktor

fisika, kimia dan biologi sehingga mengakibatkan abnormalitas pada individu (Edwards, 2005). Perubahan materi genetik yang diakibatkan oleh mutagen kimia dapat diamati secara sitologi dari proses mitosis yang terjadi pada sel-sel yang sedang aktif tumbuh (ujung akar dan ujung batang). Jenis aberasi kromosom yang terjadi tergantung pada tahap siklus sel saat terkena mutagen kimia dan jenis mutagen kimia yang menginduksi kromosom (Hall, 2000).

Etidium bromida bersifat karsinogenik dan mutagenik dalam konsentrasi tertentu. Ditemukan penurunan berat bersih sebesar 50% pada kultur jaringan '*Indiangrass*' setelah perlakuan 250 mgL^{-1} etidium bromida selama 24 jam (Stephens, 2009). Hasil penelitian pada bakteri *Salmonella* menunjukkan bahwa etidium bromida adalah mutagen yang menyebabkan gangguan pada metabolisme bakteri tersebut (MacCannet *al.*, 1975). Telur landak laut yang terkena $50 \text{ }\mu\text{M}$ atau lebih etidium bromida memiliki kelainan kromosom dan mengalami kegagalan pembelahan sel (Vacquier and Brachet, 1969).

Kemampuan etidium bromida untuk berinterkalasi memiliki potensi berbahaya bagi makhluk hidup. Pengujian kerusakan kromosom yang disebabkan oleh etidium bromida pada tingkat molekuler yaitu

tingkat kromosom tumbuhan perlu dilakukan. Bawang merah dapat dijadikan sebagai model untuk studi mekanisme mutagenesis pada kromosom yang diinduksi oleh bahan kimia seperti etidium bromida. Jumlah kromosom yang tidak terlalu banyak yaitu $2n=16$ (Sastrosumarjodkk., 2006) serta fase mitosis yang jelas terlihat menjadikan bawang merah ideal digunakan dalam mempelajari kerusakan kromosom pada tanaman, selain itu kromosom bawang merah memiliki ukuran yang besar dan cukup mudah untuk dibuat preparatnya (Sastrosumarjo, 2006).

Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi kerusakan kromosom yang diakibatkan oleh etidium bromida pada perendaman 6 dan 12 jam dengan konsentrasi 500 ppm yang dilihat pada saat fase mitosis pada akar bawang merah. Pengamatan kromosom dilakukan dengan teknik *squash* pada ujung akar bawang merah.

MATERI DAN METODE

Pembuatan Larutan Etidium Bromida

Konsentrasi larutan etidium bromida yang digunakan sebagai perlakuan untuk perendaman akar bawang merah adalah 500 ppm. Larutan etidium bromida dibuat dengan melarutkan etidium bromida sebanyak 15 mg dalam 30 ml aquades.

Pengakaran Bawang Merah dan Perendaman dengan Etidium Bromida

Induksi akar bawang merah dilakukan dengan cara merendam bagian bawah umbi bawang merah dalam air pada gelas plastik. Perendaman dalam air dilakukan selama 7 hari atau hingga panjang akar 4-5cm.

Akar bawang merah yang telah tumbuh 4-5cm direndam pada larutan etidium bromida. Akar yang direndam adalah bagian ujung akar hingga mencapai $\frac{3}{4}$ bagian akar (tidak sampai menyentuh bagian pangkal umbi bawang merah). Akar direndam selama 6 jam dan 12 jam.

Pengamatan Kromosom

Ujung akar bawang merah yang telah direndam dalam larutan etidium bromida dipotong pada pukul 07.00-08.30 dan pukul 09.00-10.00 sepanjang 1-2 cm. Akar yang telah dipotong dimasukkan ke dalam lima tabung Eppendorf yang telah diisi larutan fiksatif farmer's (Etanol absolut:asam asetat glasial (3:1)), masing-masing tabung berisi 2 akar yang berasal dari satu umbi.

Preparat akar bawang merah dibuat dengan metode *squash*. Setelah ujung akar difiksasi dengan larutan fiksatif selama 1-24 jam pada suhu -20° C, akar dicuci dengan aquades dan dihidrolisa dengan HCL 2N pada suhu 60° C selama 2-3

menit. Setelah dihidrolisa, akar dibilas dengan aquades kemudian diletakkan diatas gelas benda dan dipotong 1-2mm, ditetesi pewarna *acetoorcein* 2% sebanyak satu tetes, dibiarkan selama 30 menit-1 jam, preparat ditutup dengan *cover glass* dan ditekan dengan kertas saring sambil diisap sisa pewarna yang tercecer disekitar kaca penutup. Selanjutnya preparat dipanaskan diatas api bunsen selama 1 menit agar pewarna meresap dengan sempurna. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x40.

Analisis Data

Dihitung jumlah sel yang mengalami kerusakan kromosom pada fase tertentu saat mitosis serta jumlah semua sel pada preparat, kemudian ditentukan persentase kerusakan kromosom yang terjadi akibat perendaman etidium bromida. Berikut rumus yang digunakan untuk menghitung persentase kromosom yang rusak :

Persentase kromosom yang rusak =

$$\frac{\sum \text{sel yang mengalami kerusakan}}{\sum \text{sel yang diamati}} \times 100\%$$

HASIL

Hasil menunjukkan bahwa mitosis dapat diamati pada pemotongan pukul 07.30-09.00. Persentase sel yang mengalami kerusakan dan tipe kerusakan

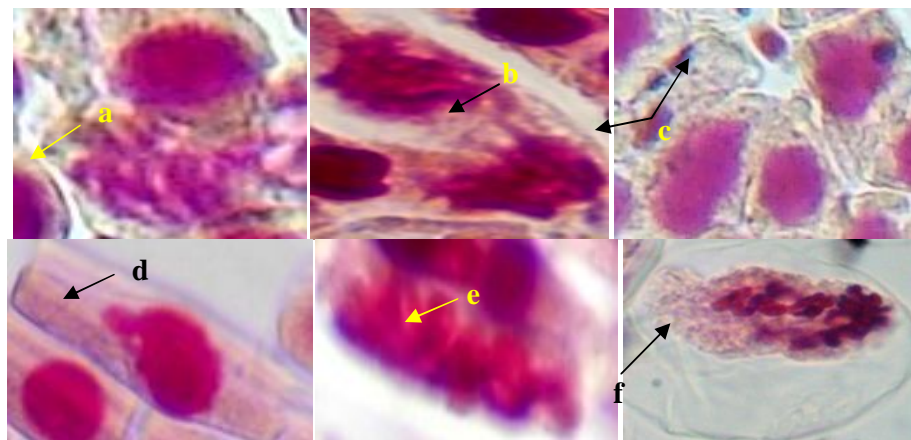
kromosom akibat perendaman etidium bromida dapat dilihat pada Tabel 1. Persentase rata-rata kerusakan kromosom pada perendaman dengan etidium bromida selama 6 jam yang diamati pada 7 akar

adalah 2,99%. Pada perendaman selama 12 jam yang diamati pada 6 akar, didapat persentase rata-rata sebesar 6,81%. Kerusakan yang terjadi ditampilkan pada Gambar 1.

Tabel 1. Persentase kerusakan kromosom akibat perendaman etidium bromida

Lama Perendaman	Rasio sel dengan kromosom abnormal per total sel yang diamati	Persentase sel yang mengalami kerusakan kromosom	Rata-rata persentase sel dengan kerusakan kromosom
6 jam			
Akar 1	3/161	1,86%	2,99%
Akar 2	1/84	1,19%	
Akar 3	2/78	2,56%	
Akar 4	4/80	5%	
Akar 5	2/39	5,13%	
Akar 6	3/120	2,5%	
Akar 7	2/75	2,67%	
12 jam			
Akar 1	10/64	15,63%	6,81%
Akar 2	9/114	7,89%	
Akar 3	3/26	11,54%	
Akar 4	1/52	1,92%	
Akar 5	1/71	1,41%	
Akar 6	2/81	2,47%	

Keterangan : Perbesaran 400x



Gambar 1. Jenis kerusakan kromosom akibat perendaman etidium bromida selama 6 dan 12 jam: a) kromosom tampak terpotong-potong (terfragmentasi), b) jembatan kromosom pada anafase, c) 2 mikronuklei, d) inti sel membentuk tunas (*nuclear bud*), e) kromosom tampak menyatu, f) kromosom berada pada satu bidang dan di sebelah sisinya terdapat kromosom yang bergerombol

PEMBAHASAN

Pemotongan akar bawang untuk membuat pengamatan kromosom dilakukan pada waktu-waktu tertentu agar dapat ditemukan fase mitosis bawang merah. Pada penelitian ini kromosom dapat terlihat jelas pada pemotongan akar pukul 07.30-09.00. Kromosom teramati pada fase profase, metafase dan anafase. Perendaman akar dengan etidium bromida selama 6 dan 12 jam menyebabkan terjadinya kerusakan kromosom yaitu kromosom tampak terpotong-potong, terbentuk mikronuklei, 'tunas' nukleus dan jembatan kromosom.

Kerusakan kromosom berupa fragmentasi kromosom atau kromosom tampak terpotong-potong ditemukan pada penelitian Amer and Ali (1969) yang menggunakan pentachloropenol (sejenis pestisida) pada *Vicia faba*. Larutan pestisida lain yang dilaporkan menyebabkan fragmentasi kromosom antara lain ferbam pada *Allium cepa* (Prasad and Pramer, 1968), linuron pada *Hordeum* sp. (Wuu and Granat, 1966), dan simazin pada *Vicia cracca* (Tomkins and Granat, 1976). Patahan kromosom (fragmentasi) dapat terjadi akibat putusannya lengan kromosom pada tempat tertentu. Kromosom yang putus dapat tersambung kembali dengan bagian potongan kromosom asalnya atau

dengan potongan kromosom lain (Suryo, 1995).

Alel mutan pada jagung dilaporkan menyebabkan terjadinya distribusi jumlah kromosom yang tidak merata menuju kutub, hal ini disebabkan oleh distribusi abnormal dari mikrotubuli (Liu and Inna, 1993). Aberasi kromosom berupa *sticky*, C-metafase, *laggard* dan binukleat ditemukan pada sel meristematis akar *Vigna mungo* akibat pemaparan kromium (Chidambaram *et al.*, 2009). Jembatan kromosom dapat terjadi karena inversi parasentrik yang terjadi saat pindah silang sehingga pada bagian inversi akan menghasilkan kromosom dengan sentromer yang membentuk jembatan dengan sentromer lain. Multipolar anafase terjadi karena kromosom bergerak bersamaan pada empat kutub berlawanan yang disebabkan oleh tarikan benang spindel (Xiao-wei, 2004).

Terbentuknya mikronuklei merupakan kejadian yang sering terjadi pada kerusakan kromosom. Azlia dan Wardini (2010) melaporkan terjadi aberasi kromosom dan mikronuklei di sel ujung akar *Allium cepa* yang disebabkan oleh air lindi (air limbah yang diproduksi oleh tempat pembuangan akhir sampah). Aberasi kromosom dan mikronuklei juga ditemukan pada tanaman lainnya seperti

Crepisacillar(Grant and Owens, 1998) dan *Hordeumvulgare*(Gecheff, 1996). Mikronuklei adalah struktur menyerupai nukleus yang berukuran lebih kecil dari nukleus. Mikronuklei terjadi akibat kegagalan pembagian kromosom pada saat mitosis sel yaitu pada anafase. Kegagalan pembagian kromosom ini akan meninggalkan sebuah struktur menyerupai nukleus dan ukuran lebih kecil (Lusiyantidkk., 1996).

Mutagen kimia dapat menyebabkan aberasi kromosom yang terjadi dengan beberapa cara. Pertama, mutagen kimia secara langsung mempengaruhi DNA dan menimbulkan aberasi kromosom. Kedua, mutagen kimia dapat mengganggu sintesis DNA dan protein sehingga menyebabkan terbentuk pergerakan kromosom abnormal yang menyebabkan aberasi kromosom. Ketiga, kandungan dalam mutagen kimia dapat mencegah perbaikan kromosom yang tidak normal (Xiao-wei, 2004).

Etidium bromida dapat menginterkalasi asam nukleat sehingga umum digunakan dalam bidang biologi molekuler. Molekul etidium mengkelat pada susunan DNA yang kokoh sehingga dapat merusak struktur *double helix* dan menghambat replikasi DNA, transkripsi, perbaikan DNA, dan rekombinasi (Reha *et al.*, 2003). Berdasarkan analisis waktu

yang dihabiskan untuk pra kopulasi dan kopulasi, etidium bromida memiliki efek negatif dalam semua tahap perkembangan telur, larva, pupa, dan dewasa dari sepuluh generasi *Drosophila melanogaster* yang terkena perlakuan 30 μ M etidium bromida selama 15 hari. Hasilnya menunjukkan bahwa etidium bromida mengganggu kelangsungan hidup telur, larva, pupa, dan dewasa *Drosophila melanogaster*. Data yang didapat menunjukkan bahwa etidium bromida memiliki pengaruh dalam perkembangan gen yang menyebabkan beberapa individu menjadi tidak *viabel* untuk mencapai fase dewasa (Ouchiet *al.*, 2007). Telur landak laut yang terpapar 50 μ M larutan etidium bromida mengalami perkembangan kromosom yang abnormal dan kegagalan kromosom untuk membelah (Vacquier and Brachet 1969).

Kerusakan kromosom pada akar bawang merah (*Allium cepa* L.) akibat perendaman dalam etidium bromida ini menunjukkan bahwa etidium bromida tidak hanya memiliki efek negatif pada hewan dan bakteri, tetapi juga pada tumbuhan.

SIMPULAN

Terjadi kerusakan kromosom karena perendaman akar bawang merah dengan etidium bromida. Kerusakan yang terjadi yaitu kromosom tampak terpotong-potong,

terbentuk mikronuklei, 'tunas' nukleus dan jembatan kromosom. Persentase kerusakan pada perendaman 12 jam lebih besar yaitu 6,81% dibanding perendaman 6 jam yaitu 2,99%.

KEPUSTAKAAN

- Amer, S.M., E.M. Ali. 1969. Cytological Effects of Pesticides. IV. Mitotic Effects of Some Phenols. *Cytologia*. 34:1
- Azlia, N., T.H. Wardini. 2010. Toksisitas Air Lindi TPAS (Tempat Pembuangan Akhir Sampah) Sarimukti pada Umbi Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Program Studi Sarjana Biologi SITH. (Skripsi) Tidak dipublikasikan
- Chidambaram, A., P. Sundaramoorthy, A. Murugan, K.S. Ganesh, L. Baskaran. 2009. Chromium induced cytotoxicity in blackgram (*Vigna mungo* L.). Iran. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 6: 17-22
- Edwards, A.A. 2005. The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry, *Radiation research*. 148: 539-544
- Gecheff K.I. 1996. Production and Identification of New Structural Chromosome Mutations in Barley (*Hordeum vulgare* L.) *Theor. Appl. Genet.* 92: 81-777
- Grant, W.F., E.T. Owens. 1998. Chromosome Aberration Assays in *Crepis* for the Study of Environmental Mutagens. *Mutat. Res.* 410: 291-307
- Hall, E. J. 2000. *Radiobiology for the Radiobiologist* 5th Edition. JB Lippincott Company Philadelphia
- Liu, Q., G. Inna. 1993. Abnormal Cytoskeletal and Chromosome Distribution in PO, ms4 and ms6; Mutant Alleles of Polymitotic that Disrupt the Cell Cycle Progression from Meiosis to Mitosis in Maize. *J. of Cell Sci.* 106-1169
- Lusiyanti, Y., I. Iwiq, W. Abdul. 1996. Studi Awal Mikronuklei Pada Sel Limfosit Perifer Massnelly. *PSPKDR. Batan.* 1-4
- MacCann, J., E. Choi, E. Yamasaki, B.N. Ames. 1975. Detection of Carcinogens as Mutagens in the Salmonella/Microsome Test: Assay of 300 Chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72:5135-5139
- Ouchi, R. Y., A. J. Manzato, C. R. Ceron, G.O. Bonilla-Rodriguez. 2007. Evaluation of the Effects of a Single Exposure to Ethidium Bromide in *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae). *Bull. Env. Cont. Tox.* 1-3
- Prasad, I., D. Pramer. 1968. Genetics Effects of Ferbam on *Aspergillus niger* and *Allium cepa*. *Phytopathology* 58:1188
- Reha, D., M. Kabelác, F. Ryjáček, J. Šponer, J.E. Šponer, M. Ištner, S. Suhai, P. Hobza. 2003. Intercalators Nature of stacking interactions between intercalators (etidium, daunomycin, ellipticine, and 4',6-diaminide-2-phenylindole) and DNA base pairs. Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potential study. *J. American Chem. Soc.* 124: 66-76

- Sastrosumarjo, S. 2006. *Sitogenetika Tanaman*. IPB Press. Bogor
- Sastrosumarjo, S., S.I. Yudiwanti, S. Aisyah, M. Sujiprihati, R. Syukur, Yuniarti. 2006. *Panduan Laboratorium Sitogenetika Tanaman*. IPB Press. Bogor
- Stephens, L.C. 2009. Etidium Bromida-induced Mutations from Inflorescence Cultures of Indiangrass. *Hort. Sci.* 44:1215-1217
- Suryo, 1995. *Sitogenetika*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Tomkins, D.J., W.F. Granat. Monitoring Natural Vegetation for Herbicide Induced Chromosomal Aberration. *Mutat. Res.* 36:73
- Vacquier V.D., J. Brachet. 1969. Chromosomal Abnormalities Resulting from Ethidium Bromida Treatment. *Natural.* 222:193-195
- Wuu, K.D., W.F. Granat. 1966. Morphological and Somatic Chromosomal Aberations Induced by Pesticides in Barley (*Hordeum vulgare*). *Can. J. Genet. Cytol.* 8:481
- Xiao-wei, K. 2004. Mutagenic Effects of Chromium Trioxide on Root Tip Cells of *Vicia faba*. *J. Zhejiang University Sci.* 5, 12: 1570-1576