Stigma Volume VIII No.2, April-Juni 2000

HAMBATAN PEMBENTUKAN BIJI PADA PERSILANGAN ANTAR-JENIS "OILRAPE" DAN JABUNG LIAR SERTA ANALISIS HORMON TUMBUH BAKAL BIJINYA

(Internal barrier of seed set in interspecific hybridization between oilrape and wild "jabung", and analysis on growth hormones in their ovules)

Mansyurdin *

ABSTRACT

Internal barrier of seed set in an interspecific hybridization of oilrape (*Brassica napus*) and wild "jabung" (*B. juncea*) was observed on stage of embryo development by a parafin method. To study the fairlure of embryo development, concentration of IAA, zeatin and GA_3 in the ovules were measured by a thin layer chromatography – spectrophotodensitometry method. The result showed that internal barrier of seed set in a cross combination of oilrape (maternal parent) with "jabung" was occured at heart stage, meanwhile the concentration of IAA decreased drastically from 15.08 to 5.69 ng, that of zeatin from 32.29 to 11.95 ng, and that of GA_3 from 3.38 to 1.74 ng per 100 mg dry weight of ovules at the heart embryo stage. In the reciprocal cross combination, internal barrier of seed set was occured at torpedo stage, meanwhile the concentration of IAA was sharply declined from 17.77 to 5.08 ng, zeatin from 33.89 to 15.77 ng, and GA_3 from 3.98 to 2.14 ng per 100 mg dry weight of ovules. Based on study of IAA, zeatin and GA_3 contains, and stages of embryo development would summarized that decreasing of three growth hormones in heart and torpedo embryo stages causes the embryos could not develop to next stage.

PENDAHULUAN

"Oilrape" (*B. napus*) merupakan tanaman penghasil minyak biji (Downey dan Robbelen, 1989) dan memungkinkan untuk dikembangkan di Indonesia terutama di dataran tinggi. Jenis ini rentan terhadap penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri, sedangkan kerabatnya jabung (*B. juncea*) tahan terhadap serangan penyakit tersebut (Tindall, 1983). Untuk meningkatkan ketahanan tanaman "oilrape" terhadap penyakit dibutuhkan pemindahan sifat dari jenis jabung. Pemindahan sifat dari suatu jenis ke jenis lain dapat dilakukan melalui persilangan antar-jenis (Hadley dan Openshaw, 1980). Kombinasi gen-gen baru pada hibrida antar-jenis dapat dipertahankan melalui persilangan-balik dengan induk maternalnya (Heslop-Harrison, 1990).

Persilangan antar-jenis selalu menghadapi hambatan karena jenis yang dikawinkan telah terisolasi secara seksual (Linskens, 1981) sehingga selalu ditemukan hambatan internal (Ascher, 1992). Hambatannya mungkin diekspresikan sebelum atau setelah fertilisasi. Hambatan sebelum fertilisasi dapat terjadi akibat polen tidak berkecambah di permukaan stigma (Knox *et al.*, 1972), tabung polen gagal menembus stigma (Rendle dan Murray, 1988), tabung polen berdegenerasi dalam jaringan stilus (Van der Valk *et al.*, 1988) dan tabung polen gagal memasuki mikropil (Burson, 1987; Cameron dan Reger, 1991). Hambatan setelah fertilisasi yaitu degenerasi embrio (Puttee dan Stalker, 1992), biji tidak bernas (Patel dan Datta, 1960), biji tidak berkecambah atau tanaman steril (Von Bothmer dan Jacobsen, 1989). Hambatan internal pembentukan biji pada persilangan antar-jenis "rape" dan jabung penting dikaji karena dengan mengetahui hal itu dapat dicarikan jalan keluar pemecahannya.

Menurut Quatrano (1987) bakal biji yang sedang berkembang melakukan aktivitas proliferasi, pembesaran sel, penumpukan cadangan makanan dan pematangan. Pada saat proses proliferasi dan perbesaran sel ditemukan kandungan auksin, asam giberelat dan sitokinin relatif tinggi, sedangkan pada saat penimbunan cadangan makanan dan pematangan ditemukan asam absisat (ABA) relatif tinggi. Jenis hormon tumbuh yang umum ditemukan dalam bakal biji yang sedang berkembang adalah asam indol-3-asetat (IAA) dari golongan auksin, GA_3 dari golongan asam giberelat dan zeatin dari golongan sitokinin (Krihnamoorthy, 1981; Moore, 1989). Berdasarkan hal tersebut diduga bahwa hambatan pembentukan biji pada persilangan antar-jenis "oilrape" dan jabung disebabkan oleh ketidak optimalan kadar hormon tumbuh dalam bakal bijinya.

BAHAN DAN METODA

"Oilrape" diperoleh dari Balitthor, Lembang, Jawa Barat dan jabung liar dikoleksi dari Lembang, Jawa Barat. Tanah kebun diaduk dengan pupuk sapi (9:1) dan diisikan ke dalam

* Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang

ISSN 0853-3776 AKREDITASI DIKTI No. 53/DIKTI/KEP/1999 tgl. 11 Maret 1999

kantung plastik (tinggi 40 cm; diameter 18,50 cm). Masing-masing jenis disediakan 15 batang dan dipelihara di rumah kawat. Tanaman diupuk dengan satu gram campuran TSP, ZK dan Urea (1:1:1) per pot (Permadi dan Rauf, 1987).

Metode persilangan dilakukan dengan polinasi buatan (Brown *et al.*, 1991). Bunga untuk induk biji diemaskulasi pada 12 jam sebelum bunga antesis. Polinasi dilaksanakan pagi hari dan bunga yang telah dipolinasi dibungkus "aluminium foil". Pada setiap kombinasi persilangan antar-jenis dilakukan 25 polinasi.

Hambatan pembentukan biji diperiksa pada tahap perkembangan embrio dengan selang waktu 24 jam setelah polinasi. Bakal polong difiksasi dalam larutan FAA, didehidrasi melalui seri etanol dan dalam TBA. Bahan diinfiltrasi dengan parafin bertitik leleh 46°C dan 58°C, selanjutnya ditanam dalam parafin yang terakhir. Bahan disayat dengan mikrotom putar dengan ketebalan 5 µm. Sayatan diwarnai dalam pewarnaan Hemalum-Meyer (Sass, 1958).

Untuk mengetahui ketersediaan hormon tumbuh selama perkembangan embrio dilakukan analisis bakal biji. Bakal biji dikumpulkan secara kumulatif dan dikeringkan langsung pada suhu 40°C sampai berat keringnya konstan.

Bakal biji sebanyak 100 mg digerus dan diekstraksi dalam 10 ml metanol 80%. Metanol diuapkan dan ekstrak air dibasakan dengan 0,5 N NaOH sampai pH 8,5 dan difraksinasi berturut-turut dengan n-heksan dan etil asetat. Fraksi air diasamkan dengan 0,5 N HCl sampai pH 2,8 dan diekstraksi dengan etil asetat (Gazit dan Blumenfeld, 1972). Fraksi etil asetat dan larutan IAA pembanding ditotolkan pada pelat silika gel 60 GF_{254} 20X20 cm^2 (Merck). Pelat dikembangkan dalam larutan n-heksan – n-butanol (65:35) dan disemprot dengan pereaksi van Urk (Kaldewey, 1969). Kadar IAA diukur dengan spektrofotodensitometer (CAMAG Scanner II V3.15/PC/CATS Version-3.12) dan dihitung dengan rumus seperti di bawah ini:

$$\text{Kadar sampel} = \frac{\text{Kstd} \times \text{Aspl}}{\bar{\text{A}}\text{std}}$$

Keterangan: Kstd = kadar standar
Aspl = area sampel
$\bar{\text{A}}$std = rata-rata area standar

Zeatin diekstraksi dalam pelarut yang seperti pada ekstraksi IAA. Ekstrak air diasamkan dengan 0,5 N HCl sampai pH 1,5 dan difraksinasi dengan etil asetat. Fraksi air dinetralkan dengan NH_4OH 25% sampai pH 7,0. Sampel (fraksi air) bersama zeatin pembanding ditotolkan pada pelat silika gel 60 GF_{254} 20X20 cm^2 (Merck). Pelat dikembangkan dalam larutan isopropanol – air (80:15) dan bercak dilihat di bawah sinar UV_{254nm} (Yoshida dan Oritani, 1972). Kadar zeatin diukur dengan alat spektrofotodensitometer (CAMAG Scanner II V3.15/PC/CATS Version-3.12) dan dihitung dengan rumus yang sama seperti pengukuran kadar IAA.

GA_3 diekstraksi dalam pelarut yang sama seperti pada ekstraksi IAA dan zeatin. Ekstrak air itu difraksinasi dengan n-heksan dan fraksi air diekstraksi dengan etil asetat. Fraksi air difraksinasi dengan n-butanol (Goto dan Esashi, 1975). Sampel (fraksi n-butanol) bersama GA_3 pembanding ditotolkan pada pelat silika gel kinerja tinggi 60 GF_{254} 10X10 cm^2 (Merck). Pelat dikembangkan dalam larutan etil asetat – kloroform – asam asetat (15:5:1) (Railton dan Warcing, 1973) dengan sistem pengembang ganda. Bercak GA_3 pada pelat disemprot dengan larutan 5% asam sulfat dalam etanol 95% dan dilihat di bawah sinar UV_{366nm} (Kaldewey, 1969). Kadar GA_3 diukur dengan alat yang sama seperti pengukuran kadar IAA dan zeatin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan embrio pada persilangan antar-jenis lebih lambat dibandingkan dengan perkembangan embrio normal masing-masing induknya. Perkembangan embrio pada kombinasi persilangan *B. juncea* (induk maternal) dengan *B. napus* mampu mencapai tahap torpedo. Embrio tersebut tidak mampu berkembang ke tahap berikutnya dan berdegenerasi pada 13 sampai 17 hari setelah polinasi. Pada kombinasi persilangan sebaliknya, embrio hanya mampu berkembang sampai tahap tahap jantung. Embrio tersebut berdegenerasi pada sembilan sampai 14 hari setelah polinasi (Tabel 1). Kegagalan pada tahap embrio juga dilaporkan oleh Pandey *et al.* (1987) pada persilangan antar-jenis *Trifolium isniflorum* (induk betina) dengan *T. repens*. Embrio tahap hati tidak mampu melanjutkan perkembangan ke tahap berikutnya dan kemudian berdegenerasi. Gangguan tersebut disebabkan oleh endosperm berdegenerasi lebih awal. Kegagalan perkembangan embrio berkaitan dengan gangguan perkembangan endosperm atau endosperm kurang berfungsi. Gangguan itu merupakan implikasi ketidakserasian antara genom gamet jantan dan betina (Fatokun, 1991). Ketidakoptimalan perkembangan endosperm dapat disebabkan oleh laju pembelahan sel rendah dan kemudian endosperminya berdegenerasi sehingga embrio mati kelaparan (Hadley dan Openshaw, 1980).

Pada saat embrio tahap jantung hasil persilangan "oilrape" (induk maternal) dengan jabung, kadar IAA menurun tajam dari 15,08 ng sampai

5,69 ng, zeatin menurun dari 32,29 ng sampai 11,95 ng dan GA_3 menurun dari 3,38 ng ng sampai 1,74 ng. Penurunan tajam kadar ketiga hormon tumbuh tersebut sejalan dengan tidak berkembangnya embrio tahap jantung ke tahap berikutnya. Pada tahap jantung hasil polinasi "oilrape", kadar IAA masih meningkat dari 17,32 ng sampai 23,18 ng, zeatin meningkat dari 37,07 ng sampai 47,24 ng dan GA_3 meningkat dari 5,25 ng sampai 6,25 ng. Pada saat embrio tahap torpedo dari kombinasi persilangan sebaliknya, kadar IAA menurun tajam dari 17,77 ng sampai 5,08 ng, zeatin menurun dari 33,89 ng sampai 15,77 ng dan GA_3 menurun dari 3,98 ng sampai 2,14 ng. Penurunan itu sejalan dengan tidak berkembangnya embrio tahap torpedo ke tahap berikutnya. Pada tahap torpedo hasil polinasi jabung, kadar IAA relatif konstan yaitu antara 22,12 ng dan 21,15 ng, zeatin antara 41,21 ng dan 36,01 ng dan GA_3 antara 5,62 ng dan 5,17 ng.

Berdasarkan kedua pendekatan dalam penelitian ini dapat dinyatakan bahwa kegagalan perkembangan embrio pada persilangan antar-jenis tersebut disebabkan oleh ketidakoptimalan kadar zeatin, IAA dan GA_3. Menurut Quatrano (1987) pada saat berlangsung proliferasi dan perbesaran sel ditemukan auksin, asam giberelat dan sitokinin yang relatif tinggi. Gazit dan Blumenfeld (1972) melaporkan bahwa pada buah *Persea americana*, aktivitas IAA meningkat selama tahap pertumbuhan. Peranan fisiologi asam giberelat dalam biji adalah untuk perbesaran sel, memacu produksi auksin dan mempengaruhi aliran metabolit dari bagian lain tubuh tanaman ke dalam buah atau biji (Moore, 1989). Peranan fisiologi sitokinin dalam perkembangan buah atau biji adalah pembelahan dan pembesaran sel (Krishnamoorthy, 1981). Sitokinin dapat meningkatkan sintesis DNA dan mRNA (De dan Roy, 1974), meningkatkan penggabungan asam amino menjadi protein (Gordon dan Letham, 1975), mempengaruhi transpor metabolit organik dan mineral-mineral ke dalam sel (Krishnamoorthy, 1981).

Tabel 1. Perkembangan embrio jabung dan "oilrape" serta persilangan antar-jenisnya

Persilangan	Tahap perkembangan embrio berdasarkan hari setelah polinasi						
	Zigot	Proembrio	Globular	Jantung	Torpedo	Kotiledon awal	Kotiledon akhir
Jb X Jb	2 hsp	2-3 hsp	3-7 hsp	6-8 hsp	8-10 hsp	13-16 hsp	15-20 hsp
Jb X Or	2-3 hsp	3-5 hsp	4-6 hsp	6-7 hsp	8-16 hsp berdegenerasi (13-17 hsp)	-	-
Or X Or	2 hsp	3 hsp	4-5 hsp	5-7 hsp	7-10 hsp	13-16 hsp	15-20 hsp (es)
Or X Jb	2 hsp	3-4 hsp	4-8 hsp	8-13 hsp berdegenerasi (9-14 hsp)	-	-	-

Tabel 2. Kisaran kadar IAA, zeatin dan GA3 dalam bakal biji berdasarkan tahap perkembangan embrio "oilrape" dan jabung serta hasil persilangan antar-jenisnya

Bakal biji	Jenis hormon tumbuh	Kisaran kadar hormon tumbuh (ng/100 mg sampel) berdasarkan tahap perkembangan embrio			
		Globular	Jantung	Torpedo	Kotiledon awal
Jb X Jb	IAA	12,60-17,32	17,32-23,18	23,18-22,41	22,41-16,36
	Zeatin	28,97-37,07	37,07-47,24	47,34-43,84	43,84-30,46
	GA_3	4,08-5,25	5,25-6,25	6,25-5,99	5,99-5,24
Jb X Or	IAA	7,39-15,08	15,08-5,69	-	-
	Zeatin	17,13-32,29	32,29-11,95	-	-
	GA_3	2,97-3,38	3,38-1,74	-	-
Or X Or	IAA	11,35-18,29	18,29-22,12	22,12-21,15	21,15-15,08
	Zeatin	25,82-36,22	36,22-41,21	41,21-36,01	36,01-23,83
	GA_3	3,81-5,05	5,05-5,62	5,62-5,17	5,17-4,36
Or X Jb	IAA	7,99-14,76	14,76-16,80	17,77-5,08	-
	Zeatin	17,34-31,46	31,46-34,74	33,89-15,77	-
	GA_3	3,09-3,78	3,78-3,94	3,98-2,14	-

Keterangan: Jb = jabung; Or = "oilrape"; hsp = hari setelah polinasi

KESIMPULAN

Berdasarkan kajian kadar IAA, zeatin dan GA_3 dalam bakal biji dan tahap perkembangan embrio optimal pada persilangan antar-jenis "oilrape" dan jabung liar, maka dapat disimpulkan bahwa penurunan kadar ketiga hormon tumbuh tersebut pada saat embrio tahap jantung dan torpedo mengakibatkan embrio tidak berkembang ke tahap berikutnya.

DAFTAR PUSTAKA

Brown, A.P., J. Brown and A.F. Dyer. 1991. Optimal pollination condition for seed set after a self pollination, an interspecific cross and an interspecific cross of marrow-stem kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Euphytica*, 1: 45-51.

Burson, B.L. 1987. Pollen, germination, pollen tube growth and fertilization following self and interspecific pollination of *Paspalum* sp., *Euphytica*, 36: 641-650.

Cameron, R.G. and B.J. Reger. 1991. Hybridization barriers between wheat and rye: In vitro pollen assays and electrophoretic survey, *Euphytica*, 52:147-153.

De, D.K. and S.C. Roy. 1974. Amino acid incoperation into protein by plant mitochondria in the presence of some plant growth promoters, metabolic inhibitors and synthetic messengers, *Physiol. Plant*, 31:51-54.

Downey, R.K. and G. Rohbelen. 1989. *Brassica* species, In: *Oil Crops of the World, Their Breeding and Utilization*, G. Rohbelen, R.K. Downey and A. Ashri (editors), McGraw-Hill Publishing Co. New York, 399-462.

Fatokun, C.A. 1991. Wide hybridization in cowpea: problems and prospects, Euphytica, 54:137-140.

Gazit, S. and A. Blumenfeld. 1972. Inhibitor and auxin activity in the avocado fruit, Physiol. Plant., 27:77-82.

Gordon, M.E. and D.S. Letham. 1975. Regulators of cell division in plant tissue. XXII. Physiological aspects of cytokinin-induced radish cotiledon growth, *Aust. J. Plant Physiol.*, 2:129-154.

Goto, N. and Y. Esashi. Gibberellins in the embryonic axes of tall and dwarf beans and their changes with initial growth. *Plant and Cell Physiol.*, 16:759-766.

Hadley, H.H. and S.J. Openshaw. 1980. Interspecific and intergeneric hybridization, in: *Hybridization of Crop Plant*, Fehr, W.R. and H.H. Hadley (editors), Amer. Soc. Agron. Crop Sci. Soc. Amer. Publisher, Madison, Wisconsin, USA, 33-318.

Heslop-Harrison, J.S. 1990. Gene expression and parental dominance in hybrid plants. In: *Development 1990 Suplement*. The Company of Biologist Ltd. Great Britain, 21-28.

Kaldewey, H. "Simple" indole derivates and plant growth regulators, In: *Thin Layer Cchromatography, A Laboratory Handbook*, E. Stahl (editor), 2nd, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 471-493.

Knox,R.B., R.R. Willing and A.e. Ashford (1972). Role of pollen-wall proteins as recognization substances in interspecific incompatibilty in *Poplars*, *Nature*, 237:381-383.

Krishnamoorthy, H.N. 1981. *Plant Growth Substances Including Applications in Agriculture*. Tata McGraw-Hill Publishing Co. Ltd. New Delhi.

Linskens, H.F. 1981. Developmental biology of reproduction: current problems, *Phytomorphology*, 31:202-213.

Moore, T.C. 1989. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*, 2nd, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, London, Paris, Tokyo, Hongkong.

Pandey, K.K., J.E. Grant and E.G. Williams. (1978). Interspecific hybridization between *Trifolium repens* and *T. uniflorum*. *Aust. J. Bot.* 35, 171-182.

Patel, G.I. and R.M. Dutta. 1960. Interspecific hybridization between *Chorcorus olitorius* Linn. and *C. capsularis* Linn. and cytological basis of incompatibility between them, *Euphytica*, 9:89-110.

Patee, H.E. and H.T. Stalker. 1982. Embryogenesis in reciprocal crosses of *Arachis hypogaea* cv. No. 6 with *A. duranensis* and *A. stenosperma*, *Int. J. Plant Sci.*, 153: 341-347.

Permadi, A.H. and Z. Rauf. 1987. Pengujian daya hasil bibit stek tanas petsai Granat, *Bull. Penel. Hort.*, 15:73-76.

Railton, I.D. and P.F. Wareing. 1973. Effect of daylenght on endogenous gibberellins production by the leaves, *Physiol. Plant.* 29:436-433.

Rendle, I.N. and B.G. Murray. 1988. Breeding system and pollen tube behavior in compatibile and incompatibile crosses in New Zealand species of *Ranunculus* L. *New Zealand J. Bot.*, 26:467-471.

Quatrano, R.S. 1987. The role of hormones during seed development, In: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, P.J. Davies (editor), Martin Nijhoff, Boston, 494-514.

Sass, J.E. 1958. *Botanical Microtechnique*, 3rd, The Iowa State College Press, Ames, Iowa, USA.

Tindall, H.D. 1983. Cruciferae, In: *Vegetables in the Tropics*, McMillan Education Ltd., 109-145.

Van der Valk, P., C. Kik, F. Verstappen, J.T. Everink and J.N. de Vries. 1991. Independent segregation of two isozyme markers and inter-plant differences in nuclear DNA content in the interspecific backcross (*Allium fistulosum* L. x *A. cepa* L.) x *A. cepa* L., *Euphytica*, 55: 151-156.

Von Bothmer, R. and N. Jacobsen. 1989. Interspecific hybridization with *Hordeum guatemalense*. *Genetica*, 79:147-151.

Yoshida, R. and T. Oritani. 1972. Cytokinin glucoside in roots of the rice plant, *Plant and Cell Physiol.*, 13:337-343.

ISSN 0853-3776 AKREDITASI DIKTI No. 53/DIKTI/KEP/1999 tgl. 11 Maret 1999