

## Induksi Tetraploid Pada Tanaman Jambu Biji Merah (*Psidium guajava* L.) secara In Vitro

### (In vitro Induction of Tetraploid in Guava (*Psidium guajava* L.))

Tri Handayani\*, Witjaksono, & K. Utami Nugraheni

Pusat Penelitian Biologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

Jl. Raya Bogor Km.46, Cibinong, Kab. Bogor 16911. Indonesia

\*Email: trihandayani08@gmail.com

Memasukkan: Maret 2017, Diterima: Agustus 2017

#### ABSTRACT

Some commercial varieties of Guava seedless are triploid and rarely found naturally. A triploid variety with less seeds and better yield potential can be achieved by crossing tetraploid to diploid variety. Guava tetraploid plants can be synthetically induced by using oryzalin or colchicine to double the chromosome from its diploid. This research was aimed to obtain tetraploid lines by studying the effects of oryzalin in germination and in vitro growth of Guava. Seed from Red Guava were cultured in liquid medium MS + 2 mgL<sup>-1</sup> BA with adding oryzalin according to the treatment, then seed planted in MS solid medium. Seed explants were exposed to Oryzalin 0 (controls), 15, 30 dan 60 µM with exposure time are 23, 36 and 49 days or 3, 5, and 7 weeks. Results from polyploid induction were 8 tetraploid (5.48%) and 9 (6.16%) mixoploid shoots in vitro. High est tetraploid shoots were obtained from treatments by exposing the seed explant to 15 – 30 µM oryzalin for 23 – 36 days. Oryzalin treatments inhibit germination and in vitro growth of Guava until 1st subculture. After second subculture, tetraploid or mixoploid shoots quantitatively showed no difference respons on in vitro growth with its diploid.

**Keywords:** guava, tetraploid, seed explant, in vitro germination, polyploid

#### ABSTRAK

Beberapa varietas jambu biji seedless atau berbiji sedikit diketahui adalah triploid dan jarang ditemukan secara alami di alam. Pemuliaan tanaman triploid salah satunya dapat dicapai melalui persilangan antara induk tetraploid dengan diploid. Ketersediaan tanaman jambu tetraploid dapat diperoleh secara sintetik melalui penggandaan kromosom tanaman diploid menggunakan senyawa oryzalin atau kolkisin. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tunas in vitro jambu biji tetraploid dengan mempelajari pengaruh perlakuan oryzalin terhadap perkecambahan dan pertumbuhan tunas jambu biji secara in vitro. Biji dari varietas jambu biji merah, direndam dalam larutan MS cair + 2 mgL<sup>-1</sup> BA dengan penambahan senyawa oryzalin sesuai perlakuan, selanjutnya biji ditanam dalam media MS padat. Konsentrasi oryzalin yang ditambahkan yakni 0 (kontrol), 15, 30 dan 60 µM dengan lama waktu perendaman 23, 36 dan 49 hari (3, 5 dan 7 minggu). Hasil induksi tetraploid pada tanaman jambu biji menggunakan senyawa oryzalin menghasilkan 8 tunas tetraploid (5,48%) dan 9 tunas mixoploid (6,16%). Biji tanaman tetraploid terbanyak didapatkan dari perlakuan perendaman biji selama 23 – 36 hari dalam larutan oryzalin dengan konsentrasi 15 – 30 µM. Perendaman biji dalam larutan oryzalin akan menghambat waktu perkecambahan dan pertumbuhan tunas in vitro jambu biji sampai pada subkultur ke-1. Setelah subkultur ke-2 tunas tetraploid atau mixoploid hasil induksi menggunakan oryzalin mempunyai tingkat pertumbuhan tunas in vitro yang secara kuantitatif tidak berbeda dengan tunas diploidnya.

**Kata Kunci:** Jambu biji, tetraploid, oryzalin, perkecambahan in vitro, poliploid

#### PENDAHULUAN

Jambu biji (*Psidium guajava* L., Famili Myrtaceae) merupakan salah satu buah yang dikenal sebagai buah apel tropis dan mempunyai kandungan vitamin C sebanyak 2 – 5 kali lebih tinggi dari buah jeruk. Jambu biji termasuk salah satu tanaman buah yang dapat memproduksi sepanjang tahun, akan tetapi masih terkendala beberapa masalah seperti ketahanan terhadap hama dan penyakit, lamanya masa juvenil tanaman, masa simpan buah yang pendek,

banyaknya kandungan biji dalam buah dan sensitif terhadap cekaman lingkungan (Rai *et al.* 2010).

Pengembangan varietas jambu berbiji sedikit/ tanpa biji dengan potensi hasil yang baik mulai banyak dilakukan diantaranya dengan seleksi terhadap plasma nutfah alami, melalui mutasi atau persilangan. Buah tanpa biji semakin digemari karena kemudahan dalam mengkonsumsi, terutama buah-buahan yang diketahui mempunyai banyak biji dalam daging buah. Buah tanpa biji umumnya terjadi pada buah yang bersifat partenokarpi yakni pembentukan buah akibat

penyerbukan tanpa diikuti perkembangan ovul atau embrio, contohnya yakni pada buah pisang, nanas, atau pir. Selain itu, buah tanpa biji juga dapat dihasilkan dari tanaman triploid, dimana tanaman yang mempunyai tiga set kromosom akan gagal dalam pembentukan embrio, sehingga buah menjadi tidak berbiji (Pardal 2001).

Sebagian besar varietas komersial jambu biji adalah diploid ( $2n=2x=22$ ) sedangkan varietas jambu tanpa biji (*seedless*) adalah triploid  $2n=3x=33$ , dimana secara alami jumlahnya sangat terbatas (Pommer & Murakami 2009). Tanaman triploid dapat dihasilkan melalui persilangan antara induk tanaman diploid dengan induk tetraploid, contohnya yakni pada tanaman pisang (Bakry *et al.* 2009) atau dapat dilakukan dengan induksi kultur endosperma (Hoshino *et al.* 2011). Selain itu, induksi tetraploid (poliploid) banyak digunakan oleh pemulia tanaman untuk perbaikan genetik dengan harapan tanaman poliploid mempunyai ukuran/ biomassa yang lebih besar, metabolisme yang lebih cepat, kandungan metabolit sekunder yang lebih banyak, dan lebih tahan terhadap kondisi cekaman biotik atau abiotik (Yang *et al.* 2011; Song *et al.* 2012).

Keberhasilan induksi tetraploid dari tanaman diploid secara *in vitro* tergantung beberapa faktor, diantaranya asal eksplan, jenis dan konsentrasi senyawa mutagen yang digunakan, lama perlakuan dan penetrasi dari senyawa mutagen (Allum *et al.* 2007). Induksi poliploid (tetraploid) secara sintetik umumnya dilakukan dengan mutagen kimia dari golongan dinitroaniline anti-mikrotubule (oryzalin, kolkisin, dan triflurarin) dengan tujuan untuk menghambat pembentukan benang-benang spindel pada saat pembelahan sel sehingga terjadi penggandaan kromosom (Ascough & Staden 2008). Beberapa penelitian lebih banyak melaporkan penggunaan senyawa oryzalin dan kolkisin untuk induksi poliploid, dimana oryzalin dilaporkan sebagai agen yang lebih efektif dibandingkan kolkisin yang bersifat lebih toksik (Tamayo-Ordonez *et al.* 2016). Eksplan yang umum digunakan yakni bagian tanaman yang masih aktif membelah (meristem), diantaranya biji (Xing *et al.* 2011), kecambah (Jaskani *et al.* 2007), kalus (Hebert *et al.* 2010), embrio somatik (Samala dan Te-Chato 2012) ataupun kultur tunas *in vitro* (Poerba *et al.* 2017). Kegiatan penelitian dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan tunas tetraploid

sebagai sumber bahan tetra pada program persilangan untuk mendapatkan hibrid triploid, dengan mempelajari pengaruh perlakuan oryzalin terhadap perkecambahan dan pertumbuhan tunas jambu biji secara *in vitro*.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi LIPI dari bulan April 2016 – Juni 2017. Pengujian tingkat ploidi dilakukan dengan menggunakan Flowcytometer di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi LIPI.

Bahan yang digunakan yakni biji tanaman yang diekstrak dari buah jambu biji merah yang dijual secara komersial di pasaran. Buah yang digunakan mempunyai kualitas yang baik, bebas dari hama dan penyakit dan mempunyai berat antara 200 – 250 g/buah. Biji hasil ekstraksi dikering anginkan, selanjutnya dilakukan sterilisasi secara *in vitro* dengan menggunakan larutan hypoclorit dan alkohol 96% untuk mengurangi investasi bakteri dan jamur.

Percobaan disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap Faktorial, dengan faktor pertama adalah konsentrasi oryzalin: 0, 15, 30 dan 60  $\mu\text{M}$  dan faktor kedua adalah lama perendaman dalam larutan oryzalin: 23, 36 dan 49 hari (3, 5 dan 7 minggu). Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali dan tiap ulangan menggunakan 5 biji.

Biji yang telah disterilisasi, direndam dalam 25 ml media kultur cair (Media dasar MS + 2  $\text{mgL}^{-1}$  BA) dalam erlenmeyer yang telah ditambahkan oryzalin sesuai perlakuan yakni 0 (kontrol), 15, 30 dan 60  $\mu\text{M}$  Oryzalin (4-(Dipropylamino)-3,5-dinitrobenzenesulfonamide, massa molar 346.36  $\text{gmol}^{-1}$ ), dengan waktu perendaman yakni 23, 36 dan 49 hari. Larutan oryzalin yang diaplikasikan sebelumnya dibuat dengan membuat larutan stok oryzalin, dengan melarutkan serbuk oryzalin dalam larutan DMSO pekat.

Biji hasil perlakuan oryzalin selanjutnya ditanam dalam media kultur *in vitro* padat (Media dasar MS + 2  $\text{mgL}^{-1}$  BA + Gelrite 3  $\text{gL}^{-1}$ ) selama 8 MST sebelum dilakukan subkultur pada media yang sama untuk proliferasi tunas. Subkultur tunas *in vitro* hasil perlakuan oryzalin

dilakukan setiap 8 – 12 minggu sekali, dengan menanam potongan tunas berukuran 2 – 3 ruas setiap kali subkultur. Setiap kali dilakukan subkultur, tunas yang tumbuh diberi nomor yang berbeda untuk mengetahui asal perlakuan.

Pengamatan karakter pertumbuhan tanaman dilakukan dengan menghitung persentase perkecambahan biji, tinggi dan jumlah tunas yang tumbuh setelah diberi perlakuan oryzalin. Pengamatan dilakukan setiap 1 minggu sekali selama 8 MST. Setelah subkultur ke-1, karakterisasi tunas (jumlah tunas, tinggi, jumlah daun, dan jumlah ruas) dengan tingkat ploidi yang berbeda diamati setiap 4 minggu sekali.

Identifikasi tingkat ploidi dianalisis dari masing-masing tunas yang tumbuh setelah subkultur-1. Identifikasi tingkat ploidi dilakukan dengan menggunakan Flowcytometer (Partec, Germany), dengan mengacu pada protokol yang telah dikembangkan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tumbuhan Pusat Penelitian Biologi. Potongan daun yang berukuran 0,5 – 1 cm<sup>2</sup> diletakkan di petridish dan ditetesi dengan 250 µl *cystain Nucleas extraction buffer* (Partec-Germany) dan dicacah dengan silet. Hasil cacahan daun disaring dengan saringan 30µm, filtrat dimasukkan dalam tabung cuvet dan ditambah dengan 1 ml larutan buffer cystain (cystain PI absolut, RNase stok solution dan staining buffer; Partec-Germany) untuk dilakukan analisa. Sampel kontrol diploid dikalibrasi pada channel 200, tetraploid pada channel 400 dan mixoploid menunjukkan peak pada dua channel yang berbeda.

Data yang diperoleh dianalisa menggunakan

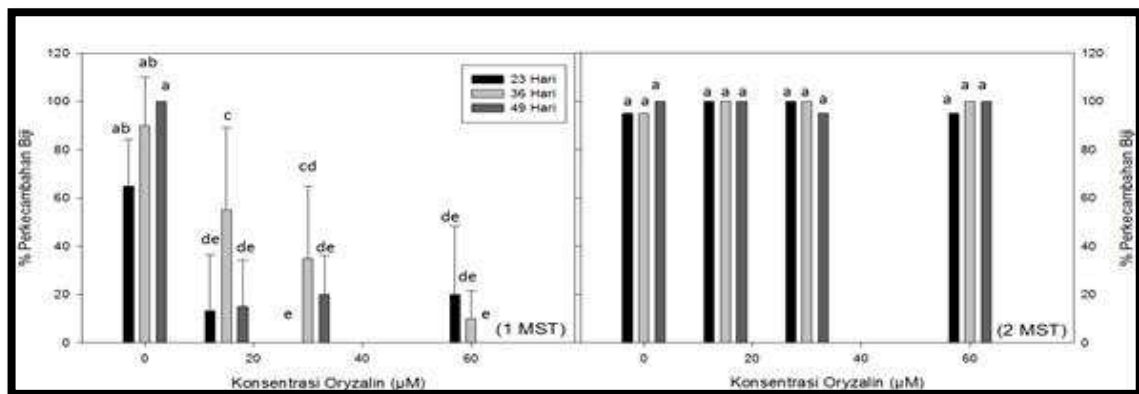
analisa ragam (uji-F) menggunakan SAS System 9.1. Apabila hasil uji menunjukkan pengaruh nyata dilakukan dengan uji lanjut DMRT (Duncan's Multiple Range Test) pada taraf kesalahan 5%. Data hasil analisa Flowcytometer ditunjukkan dengan grafik dan nilai rata-rata ± StDevisi.

## HASIL

### Perkecambahan biji dan pertumbuhan tunas in vitro jambu biji merah

Persentase perkecambahan biji menunjukkan pengaruh yang nyata akibat perlakuan konsentrasi, lama waktu perendaman serta interaksi diantaranya hanya pada minggu pertama setelah perlakuan. Persentase biji yang berkecambah pada media MS padat pada perlakuan kontrol berkisar 60 – 100% dan pada perlakuan oryzalin berkisar antara 10–60%. Persentase biji berkecambah semakin menurun dengan semakin tingginya konsentrasi oryzalin yang diberikan (Gambar 1a). Selain pada perlakuan kontrol, persentase perkecambahan biji tertinggi didapatkan pada perlakuan perendaman dalam oryzalin 15 µM selama 36 hari.

Pada minggu kedua setelah biji ditanam dalam medium padat, hampir semua biji telah berkecambah (Gambar 1b), sehingga perlakuan perendaman dalam oryzalin tidak menunjukkan pengaruh yang nyata. Dari parameter perkecambahan biji terlihat bahwa perlakuan oryzalin (konsentrasi dan lama perendaman) hanya berpengaruh terhadap waktu (lamanya) biji berkecambah tetapi tidak mengurangi persentase tingkat perkecambahan biji.



**Gambar 1.** Perkecambahan biji tanaman Jambu biji merah pada media kultur in vitro (padat)

**Keterangan:** 1a) persentase perkecambahan pada 1 minggu setelah tanam dan 1b) persentase perkecambahan pada 2 minggu setelah tanam, perlakuan konsentrasi oryzalin 0, 15, 30 dan 45 µM; perendaman oryzalin selama 23 hari, 36 hari dan 49 hari), huruf yang sama pada grafik menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji lanjut DMRT

Penghambatan pertumbuhan tunas in vitro tanaman jambu biji akibat perlakuan oryzalin terlihat dari kecepatan pertumbuhan tinggi tunas dan jumlah daun yang terbentuk. Pada tunas umur 8 MST, perbedaan tinggi tunas antara perlakuan kontrol dengan perlakuan oryzalin pada perendaman 23, 36 dan 49 hari berturut – turut adalah sekitar 47,82-58, 69%, 66,76-76,30%, dan 83.78-88.99% (Gambar 2). Penambahan oryzalin pada media perkecambahan juga menghambat pembentukan daun, seperti yang terlihat pada Gambar 2 (bawah). Pada perlakuan perendaman oryzalin 36 hari, pembentukan daun tunas pada perlakuan kontrol mulai terbentuk pada minggu ke 4, sedangkan daun dari tunas yang tumbuh pada media dengan penambahan oryzalin mulai terbentuk pada minggu ke-7 (oryzalin 15 µM), dan minggu ke-8 (oryzalin 30 dan 60 µM) (Gambar 2).

Pengamatan karakter pertumbuhan tinggi dan jumlah daun pada tunas hasil perkecambahan biji, menunjukkan bahwa semakin lama perendaman biji dalam larutan oryzalin maka perbedaan tinggi tanaman dan jumlah daun antara perlakuan kontrol dan perlakuan oryzalin semakin nyata, akan tetapi antar perlakuan konsentrasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

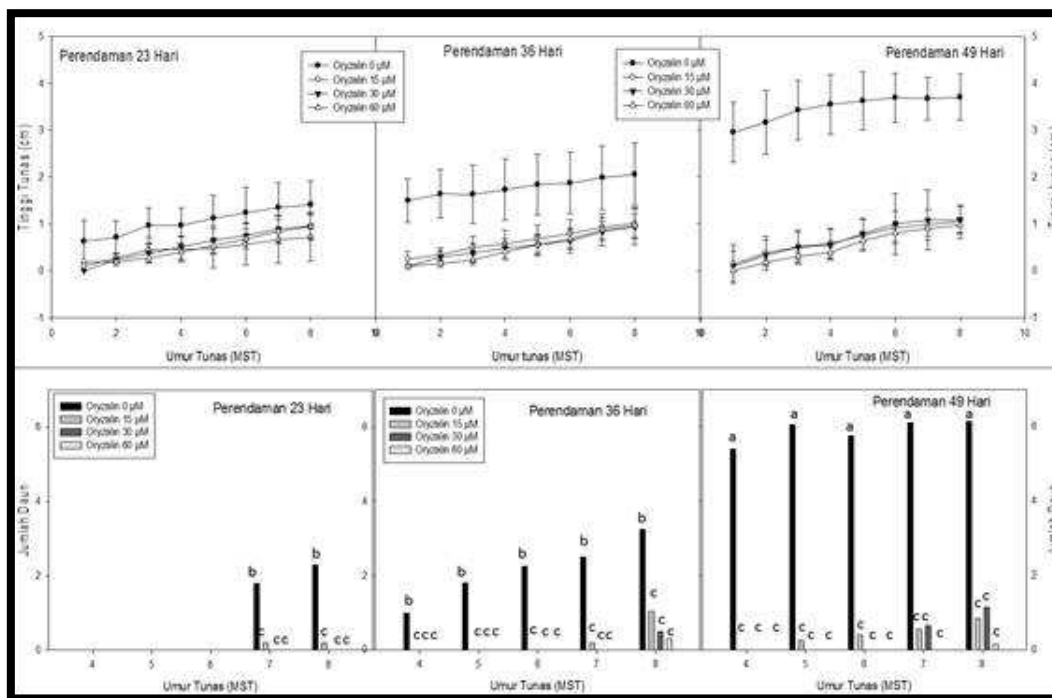
### Analisa tingkat ploidi tunas in vitro hasil induksi poliploid

Hasil pengukuran Flowcytometer (Tabel 1) dengan contoh grafik analisa pada Gambar 3, menunjukkan rata-ran ukuran peak untuk tunas diploid berkisar pada channel  $194,803 \pm 41,582$ , tetraploid pada channel  $408,853 \pm 56,649$  dan tunas mixoploid terdapat dua peak pada kisaran ukuran channel 200 dan 400, dengan koefisien keragaman (CV%) berkisar dari 5 – 8,5%.

Hasil analisa tingkat ploidi dengan flowcytometer dari tunas in vitro jambu yang tumbuh pada media kultur disajikan pada Tabel 2. Hasil analisa menunjukkan bahwa 5,48% tunas tetraploid dan 6,16% mixoploid. Tunas tetraploid lebih banyak didapatkan dari perlakuan perendaman 23 hari – 36 hari dengan konsentrasi oryzalin 15 – 30 µM. Semakin tinggi konsentrasi oryzalin dan semakin lama waktu perendaman, jumlah tunas tetraploid atau mixoploid yang didapatkan semakin sedikit.

### Karakteristik dan pertumbuhan tunas in vitro diploid, mixoploid dan tetraploid

Morfologi tunas in vitro jambu biji merah dengan tingkat ploidi yang berbeda disajikan pada Gambar 4 dan parameter kuantitatif



**Gambar 2.** Pertumbuhan tinggi (atas) dan jumlah daun (bawah) tunas in vitro Jambu biji merah  
**Keterangan:** perlakuan perendaman oryzalin 23, 36 dan 49 hari pada konsentrasi oryzalin 0, 15, 30 dan 45 µM; umur tunas 1 – 8 minggu setelah perlakuan, huruf yang sama pada grafik menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji lanjut DMRT

**Tabel 1.** Nilai rata-rata hasil pengukuran tingkat ploidi jambu biji dengan menggunakan flow cytometer

Tingkat Ploidi	Jumlah sampel	Mean-X peak	CV%
Diploid (2n=2x)	130	P1: 194,803 ± 41,582	8,109 ± 2,077
Mixoploid (2n = 2x +4x)	9	P1: 201,606 ± 5,374 P2: 406,793 ± 85,683	8,187 ± 2,994 5,982 ± 2,294
Tetraploid (2n = 4x)	8	P1: 408,853 ± 56,649	6,009 ± 1,584

**Keterangan:** Pengujian tingkat ploidi menggunakan flowcytometer pada tunas hasil perlakuan oryzalin umur 10 minggu setelah subkultur-I, P1: nilai rata-rata ukuran chanel pada peak-I, P2: nilai rata-rata ukuran channel pada peak-II. Mean-x: rata-rata ukuran chanel yang terbaca, CV (Coefisien of variant).

**Tabel 2.** Tingkat ploidi tunas in vitro Jambu biji merah hasil analisa flow cytometri pada perlakuan oryzalin

Perlakuan		Jumlah tunas	Hasil analisa FlowCytometer		
Lama Perendaman	[Oryzalin] µM		2n=2x	2n=4x	2n=Mx (2x+4x)
23 Hari	0	16	16 (100%)	-	-
	15	10	7 (70,0%)	2 (20,0%)	1 (10,0%)
	30	9	7 (77,8%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)
	60	21	20 (95,2%)	-	1 (4,8%)
36 Hari	0	5	5 (100%)	-	-
	15	8	6 (75,0%)	-	2 (25,0%)
	30	9	5 (55,6%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)
	60	7	5 (71,4%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)
49 Hari	0	5	5 (100%)	-	-
	15	13	12 (84,6%)	1 (7,7%)	-
	30	23	22 (95,7%)	-	1 (4,3%)
	60	20	19 (95,0%)	-	1 (5,0%)
Total		146	129 (88,36%)	8 (5,48%)	9 (6,16%)

**Keterangan:** nilai dalam kurung merupakan persentase jumlah tunas terhadap total tunas yang dianalisa menggunakan flow cytometri pada setiap perlakuan oryzalin, analisa dilakukan pada tunas yang tumbuh setelah subkultur-1, diploid 2n=2x, tetraploid 2n=4x dan mixoploid 2n=2x+4x

pertumbuhan tunas disajikan pada Tabel 3. Hasil pengamatan pada morfologi tunas in vitro jambu biji, menunjukkan bahwa tunas tetraploid mempunyai warna hijau daun sedikit lebih tua, dibandingkan tunas diploid atau mixoploid. Pada karakter jumlah tunas, tinggi tunas, tinggi tunas samping, jumlah ruas dan jumlah daun tidak ditemukan perbedaan nyata diantara tunas diploid, mixoploid atau tunas tetraploid (Tabel 3).

Tunas diploid, tetraploid dan mixoploid setelah subkultur-1 mempunyai karakter pertumbuhan kultur in vitro yang hampir sama. Penghambatan pertumbuhan tunas (tinggi atau jumlah daun) akibat perlakuan oryzalin, tidak terlihat setelah subkultur-1. Pada subkultur ke-2 tunas diploid dengan tunas tetraploid dan mixoploid mempunyai rata-rata tinggi tunas yang tidak berbeda nyata,

begitu juga dengan karakter pertumbuhan lainnya. Pengaruh toksisitas oryzalin pada penghambatan pertumbuhan tunas sebelumnya, diduga sudah berkurang sehingga pertumbuhan sel tanaman kembali normal.

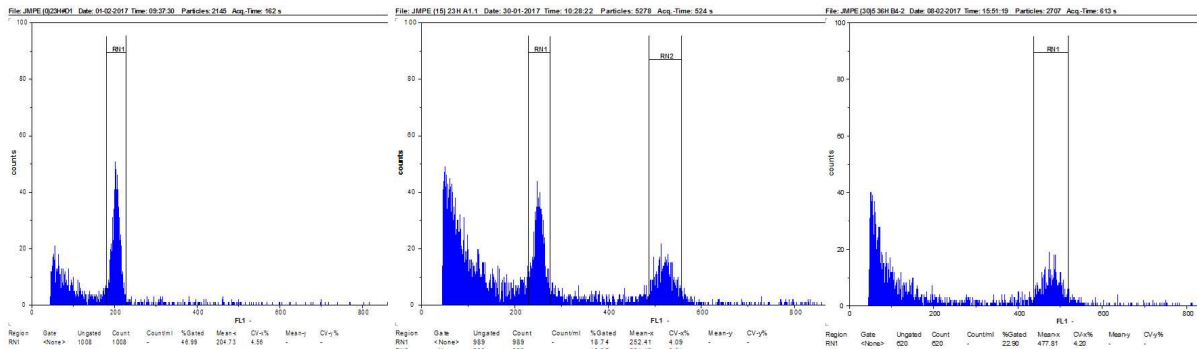
## PEMBAHASAN

Perkecambahan biji dari tanaman jambu biji merah secara in vitro membutuhkan waktu sekitar 4 – 8 minggu setelah tanam. Perendaman biji dalam larutan oryzalin pada masa perkecambahan ditujukan agar jaringan tanaman yang terpapar oryzalin pada saat pembelahan sel semakin besar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu perkecambahan tanaman jambu biji menjadi lebih lama dan terjadi penghambatan pertumbuhan tunas

**Tabel 3.** Karakteristik tunas in vitro diploid, tetraploid dan mixoploid tanaman jambu biji merah

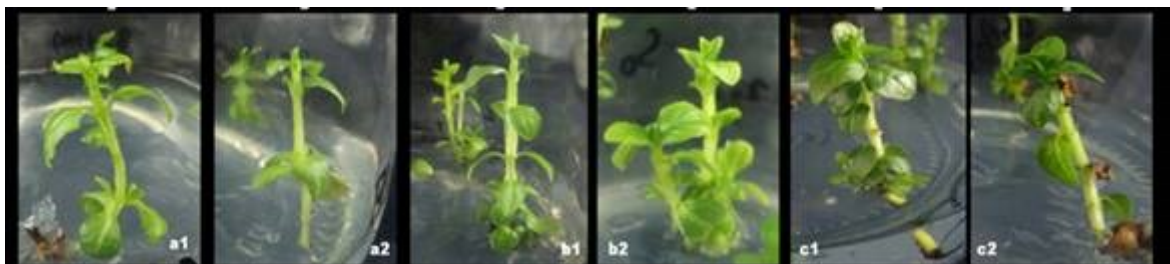
Ploidy	Karakteristik tunas in vitro				
	Jumlah tunas/ <i>clump</i>	Tinggi tunas (cm)	Tinggi tunas samping (cm)	Jumlah ruas	Jumlah daun
Diploid	1,85 ± 1,04	1,91 ± 0,66	0,98 ± 0,42	6,04 ± 1,43	12,8 ± 2,85
Tetraploid	1,38 ± 0,74	1,98 ± 0,58	1,03 ± 0,32	7,13 ± 1,73	14,2 ± 3,45
Mixoploid	1,67 ± 0,87	2,03 ± 0,74	1,29 ± 0,44	6,11 ± 1,54	12,2 ± 3,07
Uji-F	tn	tn	tn	tn	tn

**Keterangan:** Pengujian anova pada nilai  $\alpha=0,05$ , tunas umur 10 minggu setelah subkultur ke-II



**Gambar 3.** Grafik hasil analisa flow cytometri pada tunas in vitro Jambu biji dengan tingkat ploidi yang berbeda

**Keterangan:** 1) diploid (ukuran channel sekitar 200); 2) mixoploid (ukuran channel sekitar 200 dan 400); 3) tetraploid (ukuran channel 400)



**Gambar 4.** Morfologi tunas in vitro Jambu biji dengan tingkat ploidi berbeda

**Keterangan:** a1,a2) tunas diploid ( $2n=2x$ ); b1,b2) tunas mixoploid ( $2n=2x+4x$ ); c1,c2) tunas tetraploid ( $2n=4x$ )

setelah perlakuan oryzalin. Penghambatan proses perkecambahan dan pertumbuhan tanaman pada perlakuan oryzalin terjadi sebagai akibat adanya gangguan dalam proses pembelahan sel tanaman. Penambahan oryzalin akan menyebabkan penghambatan pembelahan dan pemanjangan sel, menyebabkan perubahan morfologi pada aparatus sel diantaranya pada retikulum endoplasma dan badan golgi, perkembangan sel menjadi tidak normal, adanya kerusakan sel/ jaringan sehingga membutuhkan waktu untuk bisa tumbuh normal kembali (Langhans *et al.* 2009). Semakin tinggi konsentrasi oryzalin yang diberikan, semakin banyak sel yang terpapar dan mengalami kerusakan atau kegagalan dalam pembelahan sel.

Pada penelitian ini, hasil induksi tetraploid pada tanaman jambu biji menghasilkan 8 tunas tetraploid (5,48%) dan 9 tunas mixoploid (6,16%) (Tabel 2) atau hanya sekitar 13,17% tunas yang mengalami perubahan tingkat ploidi. Tunas tetraploid paling tinggi didapatkan pada perlakuan perendaman biji dengan konsentrasi oryzalin 15  $\mu\text{M}$  dengan lama perendaman 23 hari. Efektifitas perlakuan oryzalin dalam menghasilkan tunas tetraploid pada percobaan ini hanya sekitar 5%, jauh lebih rendah dari yang telah dilaporkan diantaranya pada tanaman *Rosa rugosa* Thunb. Hybrid sebesar 35% (Allum *et al.* 2007); 15% pada tanaman Ginger (*Hedychium muluense* R.M. Smith) (Sakhanokho

*et al.* 2009); 30% pada tanaman pisang Mas lumut (Poerba *et al.* 2014) dan sekitar 50% pada tanaman talas (Wulansari *et al.* 2016). Rendahnya efektifitas untuk memperoleh tunas tetraploid diduga karena oryzalin diaplikasikan pada biji tanaman yang cenderung mempunyai lapisan kulit yang lebih keras dibandingkan eksplan kecambah, tunas muda atau kultur in vitro, sehingga paparan senyawa oryzalin pada saat pembelahan sel menjadi kurang optimal.

Pada penelitian ini, tingkat ploidi tanaman dianalisis dengan menggunakan flowcytometer. Flowcytometer banyak digunakan untuk penentuan tingkat ploidi tanaman karena dapat menganalisis dengan lebih cepat dan lebih mudah. Tingkat ploidi ditentukan dengan mengukur intensitas fluorescens relatif total DNA dari tiap sel tanaman, sehingga tidak membutuhkan sampel dalam jumlah banyak (Roux *et al.* 2003). Analisa dengan menggunakan flowcytometer dapat mendeteksi tingkat ploidi dengan jumlah populasi yang besar, teknis pengerjaan yang lebih mudah, cepat, lebih akurat serta dapat mendeteksi adanya mixoploid atau aneuploidi (Kron *et al.* 2007). Terjadinya kimera pada tingkat ploidi yakni didapatnya tunas mixoploid menunjukkan bahwa tidak semua sel dalam jaringan meristematik yang terpapar senyawa oryzalin mengalami perubahan jumlah kromosom. Mixoploid (kimera) dapat dihilangkan dengan melakukan subkultur terus menerus sehingga diperoleh mutan yang utuh (solid) (Poerba *et al.* 2017).

Hasil karakterisasi tunas in vitro jambu biji pada parameter pertumbuhan tunas in vitro pada subkultur ke-2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata diantara tunas diploid, mixoploid atau tetraploid. Pengamatan secara kualitatif hanya menunjukkan bahwa tunas tetraploid menunjukkan warna daun lebih hijau dibandingkan tunas diploid atau mixoploid. Yulianti *et al.* (2015) melaporkan bahwa daun pada tunas in vitro tanaman tetraploid lebih tebal dan memiliki jumlah kloroplas dua kali lebih banyak dibandingkan tanaman diploidnya. Jumlah kloroplas yang lebih banyak berkorelasi dengan tingkat kehijauan daun, sehingga kandungan kloroplas yang lebih tinggi akan tampak lebih hijau. Pertumbuhan tunas pada subkultur ke-2, tunas tetraploid atau mixoploid

mempunyai tingkat pertumbuhan tunas in vitro yang secara kuantitatif (jumlah tunas, tinggi tunas, jumlah daun dan jumlah ruas) tidak berbeda dengan tunas diploidnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa pengaruh negatif dari penggunaan oryzalin untuk penggandaan kromosom sudah berkurang atau sel tanaman sudah mulai tumbuh secara normal.

## KESIMPULAN

Hasil induksi tetraploid pada tanaman jambu biji menggunakan senyawa oryzalin menghasilkan 8 tunas tetraploid (5,48%) dan 9 tunas mixoploid (6,16%). Tanaman tetraploid terbanyak didapatkan dari perlakuan perendaman biji selama 23 – 36 hari dalam larutan oryzalin dengan konsentrasi 15 – 30  $\mu$ M. Perendaman biji dalam larutan oryzalin akan menghambat waktu perkecambahan dan pertumbuhan tunas in vitro jambu biji sampai pada subkultur ke-1. Setelah subkultur ke-2 tunas tetraploid atau mixoploid mempunyai tingkat pertumbuhan tunas in vitro yang secara kuantitatif (jumlah tunas, tinggi tunas, jumlah daun dan jumlah ruas) tidak berbeda dengan tunas diploidnya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari kegiatan DIPA tematik Pusat Penelitian Biologi LIPI tahun anggaran 2016 – 2017. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Aryani Leksonowati, MSi., Hasrat Enggal Prayogi, SP dan semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allum, JF., DH. Bringloe & AV. Roberts. 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: The effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Reproduction*. 26:1977–1984.
- Ascough, GD. & JV. Staden. 2008. Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepidota* N.E. Brown. *Hort Science* 43 (7): 2248 – 2251.
- Bakry, F., F. Carreel, C. Jenny & JP. Horry. 2009. Genetic Improvement of Banana. In:



- Breeding Plantation Tree Crops*. S.M Jain, P.M. Priyadarshan (Eds.), 3–50. Springer, New York. <https://link.springer.com/content/pdf> [Diakses pada 20 Juli 2017].
- Hebert, CY., DH. Touchell, TG. Ranney & AV. Lebude. 2010. In vitro shoot regeneration and polyploid induction of rhododendron ‘Fragrantissimum Improved’. *Hort Science* 45 (5): 801 – 8014.
- Hoshino, Y., T. Miyashita & TD. Thomas. 2011. In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploid breeding. *Scientia Horticulture*, 130 (1):1 – 8.
- Jaskani, MJ, SW. Kwon, Z. Hussain & IA. Khan. 2007. Breeding polyploid watermelon: induction, identification and seed germination of tetraploids. Proceedings International Symposium on Prospects of Horticultural Industry in Pakistan, 28<sup>th</sup> to 30<sup>th</sup> March, 2007.
- Kron, P., J. Suda & BC. Husband. 2007. Application of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 847-876.
- Langhans, M., S. Niemes, P. Pimpl & DG. Robinson. 2009. Oryzain bodies: in addition to its anti-microtubule properties, the dinitroaniline herbicide oryzalin causes nodulation on the endoplasmic reticulum. *Protoplasma* 236: 73 – 84.
- Pardal SJ. 2001. Pembentukan buah partenokarpi melalui rekayasa genetika. *Buletin AgroBio* 4 (2): 45-49.
- Poerba, YS., T. Handayani & Witjaksono. 2017. Karakterisasi pisang Rejang tetraploid hasil induksi dengan oryzalin. *Berita Biologi* 16 (1): 85 – 93.
- Poerba, YS., Witjaksono, F. Ahmad & T. Handayani. 2014. Induksi dan karakterisasi pisang mas lumut tetraploid. *Jurnal Biologi Indonesia* 10 (2): 191 – 200.
- Pommer, CV. & KRN. Murakami. 2009. Breeding guava (*Psidium guajava* L.). In: *Breeding Plantation Tree Crops*. S.M Jain, P.M. Priyadarshan (Eds.), 83 – 120. Springer, New York. <https://link.springer.com/content/pdf> [Diakses pada 20 Juli 2017].
- Rai, MK., P. Asthana, VS. Jaiswal & U. Jaiswal. 2010. Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent development and prospects for further research. *Trees* 24: 1 – 12.
- Roux, N., A. Toloza, Z. Radecki, FJ. Zapata-Arias & J. Dolezel. 2003. Rapid detection of aneuploidy in Musa using flow cytometry. *Plant Cell Reports*. 21: 483 – 490.
- Sakhanokho, HF., K. Rajasekaran, RY. Kelly & N. Islam-Faridi. 2009. Induced polyploid in diploid ornamental Ginger (*Hedychium muluense* R.M. Smith) using colchicine and oryzalin. *Hort Science* 44 (7): 1809 – 1814.
- Samala, S. & S. Te-Chato. 2012. Ploidy induction through secondary somatic embryo (SSE) of oil palm by colchicine. *Journal of Agricultural Technology* 8 (1): 337 – 352.
- Song, L, S. Liu, J Xiao, W. He, Y. Zhou, Q. Qin, C. Zhang & Y. Liu. 2012. Review: Polyploid organisms. *Science China Life Science* 55 (4): 301 - 311.
- Tamayo-Ordonez, M., L. Espinosa-Barrera, Y. Tamayo-Ordonez, B. Ayil-Gutierrez, & L. Sanchez-Teyer. (2016). Advances and perspectives in the generation of polyploid plant species. *Euphytica*, 209: 1-22.
- Wulansari, A., AF. Martin, TM. Ermayanti. 2016. Induksi tanaman poliploid talas (*Colocasia esculenta* L.) dengan perlakuan oryzalin secara in vitro. *Jurnal Biologi Indonesia* 12 (92): 297 – 305.
- Xing, SH., G. XB Guo, Q. Wang, QF. Pan, YS. Tian, P. Liu, JY. Zhao, GF. Wang, XF. Sun & KX. Tang. 2011. Induction and Flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explant through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 1-10. <https://www.hindawi.com/journal/bmri/2011/793198/> [Diakses 21 Juli 2017].
- Yang, X., CY. Ye, ZM. Cheng & T. Tschaplinski, S Wullschleger, & W Yin. 2011. Genomic aspects of research involving polyploid plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 104: 387 - 397.
- Yulianti, F., A. Purwito, A. Husni, & D. Dinarti. 2015. Induksi tetraploid tunas pucuk jeruk Siam Simadu. *Jurnal Agronomi Indonesia* 43 (1): 66 – 71.