

# INDUKSI POLIPLIIDI MENGGUNAKAN KOLKISIN SECARA *IN VIVO* PADA BIBIT ANGGREK BULAN (*Phalaenopsis amabilis* (L.) BLUME)

## *In Vivo* Polyploid Induction Using Colchicine of Moth Orchid Seedling (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume)

Eka Martha Della Rahayu<sup>1</sup>, Dewi Sukma<sup>2\*</sup>, M. Syukur<sup>2</sup>, Sandra A. Aziz<sup>2</sup>, dan Irawati<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya—LIPI

Jl. Ir. H. Juanda 13, Bogor 16003, Jawa Barat, Indonesia

<sup>2</sup> Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

\*Email : dsukma70@yahoo.com

### Abstract

Polyploid induction on the seedlings of *Phalaenopsis amabilis* has been done using colchicine under *in vivo* condition. Polyploid were induced by dripping colchicine to the shoot tip of *P. amabilis* seedlings. The objective of this study was to obtain an effective concentration of colchicine to induce polyploidy in *P. amabilis* seedlings and to produce polyploid seedlings. Experiment was arranged in randomize completely block design with one factor, the colchicine concentration. Seedlings of *P. amabilis* were dripped with 0,01 ml of colchicine solutions (0, 1000, 2000, 3000, 4000, and 5000 mg L<sup>-1</sup>). Results of the experiment showed that increasing colchicine concentration from 1000 to 5000 mg L<sup>-1</sup> did not give significant effect to the survival and the growth of the seedlings which were observed at 24 weeks after treatment (WAT). Polyploid seedlings of *P. amabilis* could be produced by dripping colchicine at the concentration of 1000, 3000, 4000, and 5000 mg L<sup>-1</sup> but the most effective concentration was 5000 mg L<sup>-1</sup>. Polyploid seedlings of *P. amabilis* have larger size with the lower density of stomata compared with their diploid counterparts.

**Keywords:** chromosome, colchicine, *Phalaenopsis amabilis*, polyploid, stomata

### Abstrak

Induksi poliploidi pada bibit *Phalaenopsis amabilis* telah dilakukan menggunakan kolkisin secara *in vivo*. Induksi poliploidi dilakukan dengan meneteskan kolkisin pada pucuk bibit *P. amabilis*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi kolkisin yang efektif untuk induksi poliploidi bibit *P. amabilis* dan menghasilkan bibit *P. amabilis* poliploid. Percobaan disusun dalam rancangan kelompok lengkap teracak dengan satu faktor, yaitu konsentrasi kolkisin. Pucuk bibit *P. amabilis* ditetesi 0,01 ml kolkisin (0, 1000, 2000, 3000, 4000, dan 5000 mg L<sup>-1</sup>). Hasil percobaan menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi kolkisin dari 1000 sampai 5000 mg L<sup>-1</sup> tidak berpengaruh nyata terhadap persentase hidup dan pertumbuhan bibit pada 24 minggu setelah perlakuan (24 MSP). Bibit *P. amabilis* poliploid dapat dihasilkan pada penetesan kolkisin 1000, 3000, 4000, dan 5000 mg L<sup>-1</sup> dengan konsentrasi kolkisin paling efektif adalah 5000 mg L<sup>-1</sup>. Bibit poliploid memiliki ukuran stomata lebih besar dari bibit diploid sebaliknya kerapatan stomatanya lebih rendah.

**Kata kunci:** kolkisin, kromosom, *Phalaenopsis amabilis*, poliploid, stomata

## PENDAHULUAN

*Phalaenopsis* (anggrek bulan) adalah salah satu marga anggrek yang populer di pasar dunia. Marga *Phalaenopsis* memiliki sekitar 40 spesies yang tersebar di Himalaya, China, Tibet, Asia Tenggara, Formosa, Filipina, Kepulauan Andaman, Sumatera, Jawa, Kalimantan, Sulawesi, Papua dan Papua Nugini, serta Australia bagian utara (Sweet, 1980). Indonesia memiliki sekitar 5000 spesies anggrek dan sekitar 20 spesies di antaranya merupakan anggrek *Phalaenopsis* (Djafarer, 2008). Salah satu anggrek *Phalaenopsis* tersebut adalah *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. Spesies ini banyak digunakan sebagai tetua dalam pemuliaan anggrek karena *P. amabilis* mewariskan sifat bunga berukuran besar dan berwarna putih (Tang dan Chen, 2007; Djafarer, 2008).

Induksi poliploid berperan penting dalam pemuliaan tanaman anggrek. Poliploid dapat menghasilkan ukuran bunga yang lebih besar, bentuk bunga yang lebih bulat, dan warna bunga yang lebih pekat (Miguel dan Leonhardt, 2011). Poliploid juga dapat menghasilkan tanaman dengan daun yang lebih tebal, warna daun yang lebih hijau, serta diameter batang dan akar yang lebih besar (Griesbach, 1985; Chen *et al.*, 2009; Sarathum *et al.*, 2010).

Penggandaan kromosom pada tanaman dapat dilakukan dengan induksi kimia menggunakan senyawa anti mitosis seperti kolkisin (Chen *et al.*, 2009). Aplikasi kolkisin secara *in vivo* dapat dilakukan dengan cara merendam bibit (Sulistianingsih *et al.*, 2004), biji (Liu *et al.*, 2007, Omidbaigi *et al.*, 2010a), akar tanaman atau kecambah (Omidbaigi *et al.* 2010a); maupun dengan penetasan kolkisin pada pucuk kecambah atau bibit (Liu *et al.*, 2007, Jadrná *et al.*, 2010, Omidbaigi *et al.*, 2010a).

Menurut Zeng *et al.* (2006), kolkisin dapat menyebabkan efek samping pada tanaman yang diberi perlakuan. Efek tersebut berupa morfologi abnormal selama proses mutagenesis seperti daun yang menebal, warna daun lebih hijau (Ajalin *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006; Omidbaigi *et al.*, 2010a;

Omidbaigi *et al.*, 2010b; Ye *et al.*, 2010), tanaman lebih pendek dari pada tanaman kontrol (Chen *et al.*, 2006), bentuk daun berbeda dengan tanaman kontrol (Chen *et al.*, 2006; Omidbaigi *et al.*, 2010a; Omidbaigi *et al.*, 2010b), ukuran bunga lebih besar dari pada tanaman kontrol (Chen *et al.*, 2006), permukaan daun lebih kasar (Ye *et al.*, 2010), dan batang lebih tebal dari pada kontrol (Grouh *et al.*, 2011).

Konsentrasi kolkisin untuk menginduksi poliploid berbeda-beda pada setiap tanaman. Liu *et al.* (2007) melaporkan bahwa satu kali penetasan kolkisin 4000 mg L<sup>-1</sup> sebanyak 0,1 ml pada pucuk kecambah *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. dapat menghasilkan tanaman tetraploid. Hasil penelitian Jadrná *et al.* (2010) menunjukkan bahwa penetasan kolkisin 5000 mg L<sup>-1</sup> selama 3 hari berturut-turut, dapat menginduksi tanaman *Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey tetraploid. Omidbaigi *et al.* (2010a) melaporkan bahwa penetasan kolkisin 5000 mg L<sup>-1</sup> pada pucuk kecambah dapat menghasilkan tanaman *Ocimum basilicum* L. tetraploid.

Siklus pertumbuhan anggrek *Phalaenopsis* panjang, dengan satu siklus dapat membutuhkan waktu sekitar 2–3 tahun (Tang dan Chen, 2007). Chang (2007) memaparkan tahapan pertumbuhan dan perkembangan anggrek secara garis besar dari tahapan perkembangan protokorm anggrek hingga tanaman berbunga memerlukan waktu sekitar 3 tahun, sedangkan dari planlet sampai berbunga membutuhkan waktu sekitar 2 tahun.

Evaluasi keberhasilan induksi poliploid pada protokorm dan pengaruhnya terhadap morfologi bunga dengan demikian juga memerlukan waktu sekurangnya 3 tahun, sedangkan dari bibit sekurangnya 2 tahun. Induksi poliploid pada bibit diharapkan dapat mempersingkat waktu untuk mengevaluasi perubahan morfologi bunga, meskipun terdapat peluang terjadi kimera yang lebih tinggi.

Karakter tanaman terutama ukuran tanaman dapat diperbaiki melalui induksi poliploid dan fase juvenil (bibit) merupakan salah satu fase pertumbuhan cepat pada tanaman dimana sel-sel

sedang aktif membelah, sehingga aplikasi kolkisin pada fase tersebut diduga dapat memperbesar peluang diperolehnya sel-sel poliploid. Meskipun demikian, konsentrasi kolkisin efektif untuk induksi poliploidi bibit anggrek *P. amabilis* secara *in vivo* belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh konsentrasi efektif untuk induksi poliploidi bibit *P. amabilis* dan menghasilkan bibit *P. amabilis* poliploid.

## BAHAN DAN METODE

### Lokasi dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Rumah Kaca Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Treub Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (PKT KR-LIPI) mulai bulan November 2012 sampai dengan Oktober 2013.

### Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah bibit *P. amabilis* yang telah memiliki 4–5 daun dan 3–6 akar. Bibit merupakan koleksi Laboratorium Kultur Jaringan PKT Kebun Raya-LIPI, yang telah diaklimatisasi selama satu bulan. Bahan kimia yang diperlukan adalah kolkisin (Sigma) dan fungisida.

### Metode Penelitian

Proses pertama yang dilakukan adalah aklimatisasi bibit *P. amabilis*. Aklimatisasi dimulai dengan mengeluarkan bibit *P. amabilis* dari botol kultur dengan menggunakan pinset. Bibit kemudian dimasukkan ke dalam bak berisi air untuk dibersihkan dari sisa agar-agar yang masih melekat. Setelah dicuci, bibit direndam dalam larutan fungisida  $2 \text{ g L}^{-1}$  selama 5–10 menit, kemudian dibilas lagi dengan air sampai bersih. Bibit selanjutnya dikeringanginkan dan ditanam pada media tanam arang dalam pot tanah liat berdiameter 10 cm. Bibit dipelihara di rumah kaca Laboratorium Kultur Jaringan PKT Kebun Raya-LIPI. Perlakuan kolkisin diberikan setelah bibit *P. amabilis* diaklimatisasi selama satu bulan.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan kelompok lengkap teracak dengan satu faktor, yaitu konsentrasi kolkisin. Konsentrasi kolkisin yang diujikan adalah 0, 1000, 2000, 3000, 4000, dan  $5000 \text{ mg L}^{-1}$ . Setiap perlakuan masing-masing diulang sebanyak lima kali. Satu ulangan terdiri atas satu bibit yang ditanam dalam pot. Bibit *P. amabilis* ditetesi 0.01 ml kolkisin sesuai perlakuan yang diujikan. Penetasan kolkisin dilakukan satu kali pada pucuk bibit *P. amabilis*. Setelah penetasan kolkisin, bibit disungkup dengan plastik transparan untuk mencegah penguapan kolkisin. Kegiatan pemeliharaan yang dilakukan adalah dengan penyiraman setiap hari. Selain itu, bibit diberikan fungisida  $2 \text{ g L}^{-1}$  setiap dua minggu untuk pencegahan penyakit yang disebabkan oleh cendawan.

Peubah yang diamati adalah persentase hidup, serta jumlah daun dan akar selama 24 minggu setelah perlakuan (24 MSP). Setelah 24 MSP, berdasarkan pengamatan morfologi, bibit yang memiliki daun baru yang tumbuh dan tebal dipilih untuk dilakukan analisis stomata dan kromosom.

Analisis stomata dilakukan dengan metode Gantait *et al.* (2011) yang dimodifikasi. Daun dari ruas teratas yang telah membuka sempurna dipotong menggunakan gunting. Permukaan atas daun dikerik dengan pisau silet, sampai tersisa lapisan epidermis bawah. Lapisan epidermis dipotong, kemudian diletakkan di atas kaca objek. Larutan gliserin ditetaskan di atas potongan epidermis, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Tepi kaca penutup dilapisi cat kuku bening dan preparat diamati di bawah mikroskop. Pengamatan kerapatan stomata dilakukan dengan mikroskop OPTIKA M-699 pada perbesaran 100x, sedangkan pengamatan ukuran stomata dengan perbesaran 400x. Pengamatan kerapatan stomata dilakukan pada sepuluh bidang pandang yang dipilih secara acak, masing-masing seluas  $3,79 \text{ mm}^2$ . Sepuluh stomata dipilih secara acak untuk diukur panjang dan lebarnya menggunakan piranti lunak Optika Vision Lite 2.1.

Analisis kromosom dilakukan menggunakan metode Manton (1950). Ujung akar aktif dipotong sekitar 1 cm, difiksasi dalam larutan hidroksiquinolin

selama 24 jam pada suhu 4°C. Akar kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam asetat 45% selama 10 menit. Selanjutnya akar dipindahkan ke dalam larutan asam asetat 45% : HCl (3:1), sambil dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 60°C selama 3 menit. Potongan akar kemudian diletakkan pada gelas arloji yang telah ditetesi larutan orcein. Akar kemudian dipindahkan pada gelas preparat. Bagian ujung akar dipotong 1–2 mm, ditetesi orcein secukupnya kemudian kaca penutup dipasang. Selanjutnya preparat diketuk-ketuk dan dipanaskan sebentar. Preparat dibiarkan dingin kemudian ditekan halus dan dipanaskan lagi sebentar. Tepi kaca penutup diberi cat kuku bening dan preparat siap untuk diamati. Pengamatan kromosom dilakukan dengan menggunakan mikroskop OLYMPUS U–TVO.5XC-35H 12344 pada perbesaran 1000x. Tiga sel dari setiap preparat yang sama diamati.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis ragam. Apabila terdapat data dengan keragaman tinggi dan ragam tidak homogen maka dilakukan transformasi data menggunakan rumus  $\sqrt{x+1}$ . Apabila dari hasil analisis ragam terdapat pengaruh nyata dari perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf nyata 5% untuk mengetahui pengaruh beda antar perlakuan. Penghitungan jumlah kromosom menggunakan Microsoft Office Excel serta dihitung rata-rata dan standar deviasinya. Uji t pada taraf nyata 1% digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan antara ukuran dan kerapatan stomata tanaman diploid dengan poliploid.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Persentase hidup, jumlah daun dan jumlah akar serta morfologi bibit *Phalaenopsis amabilis*

Perlakuan kolkisin pada bibit *P. amabilis* tidak berpengaruh nyata terhadap persentase hidup bibit, jumlah daun dan jumlah akar pada 24 MSP. Persentase hidup bibit berkisar dari 75–100% (Tabel 1). Persentase hidup yang tidak berbeda nyata antara tanaman kontrol dan tanaman yang diberi perlakuan kolkisin diduga karena bibit relatif tahan terhadap

pengaruh kolkisin sehingga tidak sampai mematikan sel-sel meristem. Menurut Omidbaigi *et al.*, (2010b), bibit lebih tahan terhadap efek toksik dari kolkisin daripada kecambah.

**Tabel 1.** Pengaruh penetesan kolkisin terhadap persentase hidup dan pertumbuhan bibit *Phalaenopsis amabilis* pada 24 MSP

Konsentrasi kolkisin (mg L <sup>-1</sup> )	Persentase hidup (%)	Rata-rata jumlah daun <sup>x</sup>	Rata-rata jumlah akar <sup>x</sup>
0	100,0	1,4 (1,5)	2,2 (1,7)
	80,0	1,4 (1,3)	1,0 (1,3)
1000	100,0	1,0 (1,3)	1,0 (1,5)
2000	75,0	1,3 (1,2)	1,3 (1,4)
3000	100,0	0,4 (1,2)	0,6 (1,2)
4000	100,0	0,8 (1,3)	1,0 (1,4)
5000			

Keterangan: <sup>x</sup>Angka di dalam tanda kurung adalah hasil transformasi menggunakan rumus:  $\sqrt{x+1}$

Jumlah daun tidak berbeda nyata, pada semua perlakuan kolkisin, meskipun terdapat kecenderungan penurunan jumlah daun pada perlakuan kolkisin yang lebih tinggi (Tabel 1). Sampai umur 24 MSP, bibit baru memiliki 1–3 daun, hal ini menunjukkan pertumbuhan bibit yang relatif lambat. Jumlah akar juga tidak berbeda nyata antar perlakuan, menunjukkan konsentrasi kolkisin yang diberikan tidak menghambat pertumbuhan akar.

Bibit *P. amabilis* yang diberi perlakuan kolkisin menunjukkan pertumbuhan abnormal, yaitu adanya pertumbuhan daun baru yang lebih tebal dan berwarna lebih hijau, namun belum dilakukan pengamatan secara kuantitatif. Hal yang sama terjadi pada bibit *Viola x wittrockiana* yang ditetesi kolkisin pada pucuknya yang juga menghasilkan daun yang lebih tebal dan berwarna lebih hijau (Ajalin *et al.*, 2002). Perbedaan tebal daun antara tanaman tetraploid dan diploid terjadi pada *Platanus acerifolia* (Liu *et al.*, 2007) dan *Ocimum basilicum* (Omidbaigi *et al.*, 2010a). Kolkisin dapat menyebabkan efek samping, yaitu morfologi abnormal selama proses mutagenesis (Zeng *et al.*, 2006). Selanjutnya akan menyebabkan terbentuknya daun yang lebih tebal, serta ukuran bunga dan buah yang lebih besar

(Grouh *et al.* 2011). Penggandaan kromosom dan peningkatan material genetik menyebabkan volume sel poliploid biasanya membesar (Song *et al.*, 2012). Periode G-2 terjadi pada sintesis protein-protein yang diperlukan dalam proses mitosis, seperti sub-unit benang gelendong, serta pertumbuhan organel-organel dan makromolekul lainnya (Sastrosumarjo dan Syukur, 2013). Dengan demikian, saat sel terpapar kolkisin, sel telah memiliki organel-organel dan kromosom yang mengganda, namun tidak terjadi pembelahan sel sehingga ukuran sel menjadi besar. Bibit *P. amabilis* yang memiliki daun tebal dan berwarna lebih hijau kemudian diseleksi untuk analisis stomata dan kromosom.

#### Ukuran dan Kerapatan Stomata *Phalaenopsis amabilis*

Analisis stomata merupakan suatu metode yang fungsional dan ekonomis dalam menentukan tingkat ploidi pada suku Orchidaceae (Miguel dan Leonhardt, 2011). Chen *et al.* (2009) serta Miguel dan Leonhardt (2011) telah menggunakan metode tersebut untuk menentukan tingkat ploidi pada anggrek *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Odontioda* dan *Phalaenopsis*.

Perlakuan kolkisin pada bibit *P. amabilis* berpengaruh nyata terhadap ukuran dan kerapatan stomata daun (Tabel 2, Gambar 1). Panjang dan lebar stomata pada bibit *P. amabilis* yang ditetesi kolkisin 5000 mg L<sup>-1</sup> nyata lebih tinggi dibandingkan panjang dan lebar stomata pada perlakuan lainnya, sebaliknya kerapatan stomata bibit *P. amabilis* yang

pada perlakuan tersebut nyata lebih rendah daripada kontrol, perlakuan kolkisin 2000 dan 3000 mg L<sup>-1</sup>. Menurut Miguel dan Leonhardt (2011), tanaman dengan panjang stomata lebih besar 1,25x dari panjang stomata tanaman kontrol diduga sebagai tanaman poliploid. Berdasarkan hal tersebut maka dapat diduga bahwa penetesan kolkisin 5000 mg L<sup>-1</sup> dapat menginduksi terbentuknya bibit *P. amabilis* poliploid.

Bibit *P. amabilis* poliploid memiliki rata-rata kerapatan stomata sebesar 4,1 stomata per 3,79 mm<sup>2</sup>, yaitu 50% lebih rendah dari kerapatan stomata tanaman diploid (7,9 stomata per 3,79 mm<sup>2</sup>). Panjang stomata bibit *P. amabilis* poliploid lebih besar 47% daripada panjang stomata bibit *P. amabilis* diploid sedangkan lebar stomata bibit *P. amabilis* poliploid lebih besar 27% dari lebar stomata tanaman diploid (Tabel 3). Hasil yang sama dijumpai pada bibit *Ocimum basilicum* tetraploid (Omidbaigi *et al.*, 2010a) dan *Pelargonium x hortorum* cv. Black Velvet tetraploid (Jadrná *et al.*, 2010). Kerapatan stomata tanaman poliploid lebih rendah dibandingkan tanaman diploid karena ukuran stomata dan sel-sel epidermis tanaman poliploid lebih besar (Gantait *et al.*, 2011).

#### Jumlah Kromosom *Phalaenopsis amabilis*

Penghitungan kromosom pada sel-sel mitosis akar dilakukan untuk mengkonfirmasi tingkat ploidi tanaman pada sel-sel baru yang terbentuk setelah perlakuan kolkisin (Miguel dan Leonhardt, 2011). Poliploidi dapat terjadi karena

**Tabel 2.** Persentase bibit poliploid, panjang, lebar dan kerapatan stomata pada daun baru setelah 24 minggu perlakuan penetesan kolkisin pada pucuk bibit *Phalaenopsis amabilis*

Konsentrasi kolkisin (mg L <sup>-1</sup> )	Planlet poliploid (%)	Panjang stomata (µm)	Lebar stomata (µm)	Kerapatan stomata (jumlah/3,79 mm <sup>2</sup> )
0	0 (0/5)	28,4 <sup>c</sup>	25,5 <sup>bcd</sup>	7,9 <sup>a</sup>
1000	25 (1/4)	31,5 <sup>bc</sup>	27,1 <sup>b</sup>	6,4 <sup>bc</sup>
2000	0 (0/5)	28,7 <sup>c</sup>	24,9 <sup>cd</sup>	8,0 <sup>a</sup>
3000	25 (1/4)	32,6 <sup>b</sup>	26,9 <sup>bc</sup>	7,1 <sup>ab</sup>
4000	25 (1/5)	30,4 <sup>bc</sup>	24,6 <sup>d</sup>	6,4 <sup>bc</sup>
5000	50 (2/5)	38,4 <sup>a</sup>	29,5 <sup>a</sup>	5,6 <sup>c</sup>

Keterangan : angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan α 5%.

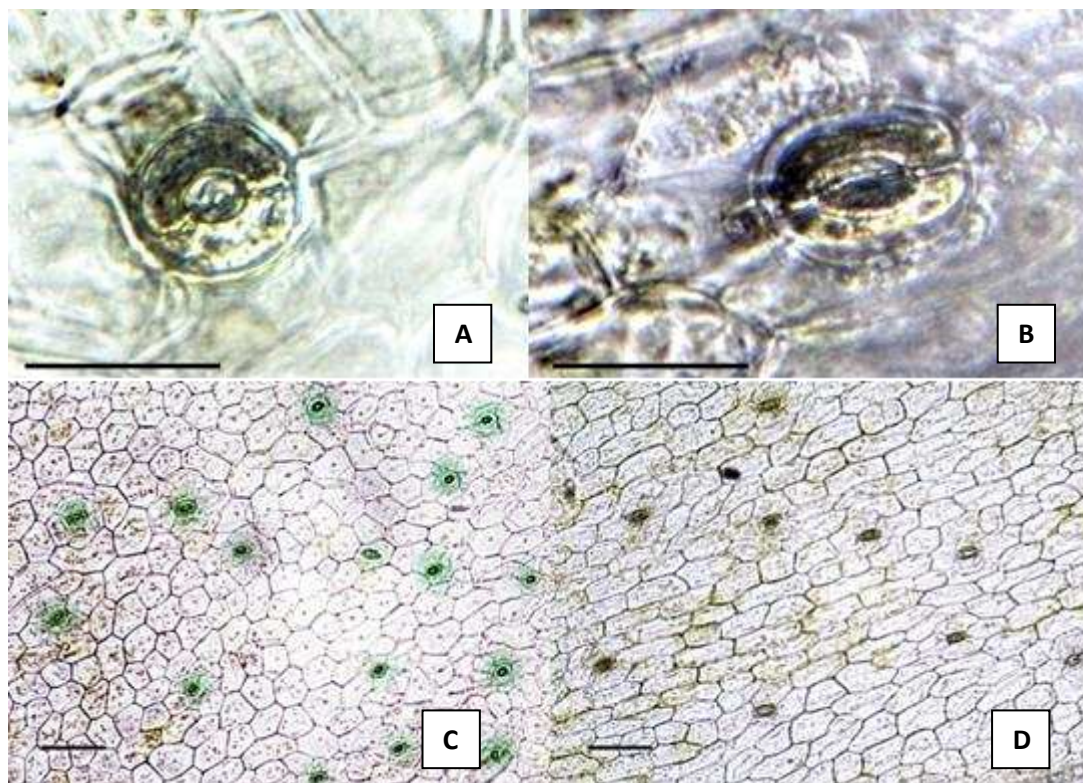


Foto: Eka Martha Della Rahayu

**Gambar 1.** Ukuran stomata bibit *Phalaenopsis amabilis* setelah 24 minggu perlakuan penetasan kolkisin: (A) diploid dan (B) poliploid, perbesaran 400x, bar = 30  $\mu\text{m}$ , dan kerapatan stomata bibit *P. amabilis* : (C) diploid dan (D) poliploid. Perbesaran 100x, bar = 100  $\mu\text{m}$

kolkisin menghambat migrasi kromosom pada saat metafase sehingga terbentuk sel-sel poliploid (Dhooghe *et al.*, 2011). *P. amabilis* memiliki jumlah kromosom yaitu  $2n=2x=38$  (Tanaka dan Kamemoto, 1984; Kao *et al.*, 2007). Hasil analisis kromosom dari bibit menunjukkan bahwa penetasan larutan kolkisin 1000, 3000, dan 4000  $\text{mg L}^{-1}$  masing-masing dapat menginduksi pembentukan satu bibit *P. amabilis* poliploid (tetraploid), sedangkan penetasan 5000  $\text{mg L}^{-1}$  dapat menginduksi pembentukan dua bibit *P. amabilis* poliploid (tetraploid) (Tabel 2).

Menurut Miguel dan Leonhardt (2011), perlakuan induksi poliploidi yang efektif adalah perlakuan yang dapat menghasilkan banyak poliploid, namun tidak mematikan tanaman. Berdasarkan hal tersebut maka konsentrasi yang efektif untuk induksi poliploidi pada bibit *P. amabilis* adalah 5000  $\text{mg L}^{-1}$ . Bibit *P. amabilis* poliploid yang dihasilkan memiliki

72–76 kromosom (Gambar 2). Meskipun jumlah kromosom yang dapat dihitung tidak semuanya dua kali lipat kromosom diploid (76), diduga perbedaan tersebut disebabkan ada beberapa kromosom yang berhimpitan atau penyerapan warna yang kurang maksimal sehingga kromosom tidak terlihat dengan jelas.

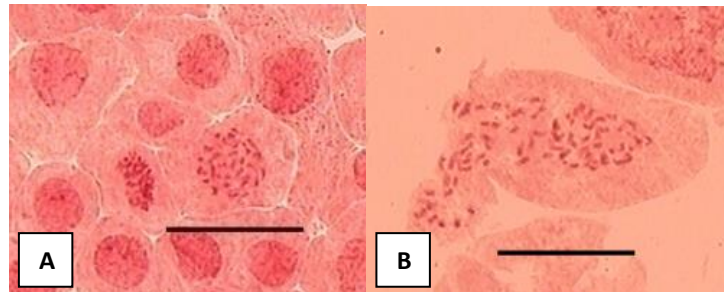
Hasil uji t untuk karakter bibit diploid (kontrol) dengan semua bibit poliploid yang diperoleh pada berbagai konsentrasi kolkisin disajikan pada Tabel 3. Hasil tersebut menunjukkan rata-rata ukuran stomata (panjang dan lebar stomata) serta kerapatan stomata antara bibit diploid dengan poliploid berbeda nyata. Peningkatan ploidi sekilas terlihat meningkatkan ukuran sel (Gambar 2). Sel-sel poliploid memiliki ukuran yang lebih besar karena membutuhkan ruang lebih besar untuk kromosom.



**Tabel 3.** Rata-rata jumlah kromosom, ukuran dan kerapatan stomata pada bibit *Phalaenopsis amabilis* diploid dan poliploid setelah 24 minggu perlakuan peneteskan kolkisin

Tingkat Ploidi	Rata-rata jumlah kromosom	Rata-rata panjang stomata ( $\mu\text{m}$ )	Rata-rata lebar stomata ( $\mu\text{m}$ )	Rata-rata kerapatan stomata (jumlah/ $3,79 \text{ mm}^2$ )
Diploid	$36,5 \pm 1,5$	27,9	24,5	8,0
Poliploid	$73,7 \pm 1,8$	41,3	31,3	4,1
Uji t		**	**	**

Keterangan: \*\* berbeda nyata berdasarkan uji t pada taraf 1%

**Gambar 2.** Kromosom dari ujung akar bibit *Phalaenopsis amabilis* setelah 24 minggu perlakuan peneteskan kolkisin. (A). diploid dan (B) poliploid. Perbesaran 1000x, bar = 20  $\mu\text{m}$ 

## KESIMPULAN

Peneteskan 0,01 ml kolkisin  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  pada bibit *Phalaenopsis amabilis* efektif untuk menginduksi poliploidi karena 50% bibit menjadi tetraploid. Ukuran stomata bibit *P. amabilis* poliploid lebih besar dibandingkan bibit *P. amabilis* diploid namun kerapatan stomatanya lebih rendah.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya–LIPI serta Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan RI atas dukungan dana melalui Hibah Strategis Nasional (Desentralisasi) a.n. Prof. Sandra A. Aziz sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Dr. Titien Ngatinem Praptosuwiryo yang telah memberikan konsultasi untuk pembuatan preparat dan analisis kromosom.

## DAFTAR PUSTAKA

Ajalin I, F. Kobza, and J. Doležel. 2002. Ploidy identification of doubled chromosome

number plants in *Viola x wittrockiana* Gams. M-1 generation. *Horticultural Science* (Prague) 29(1): 35–40.

Chang, W.C. 2007. *In vitro* morphogenesis and micro-propagation of orchids. In: Chen, W.H. and H.H. Chen (eds). *Orchid Biotechnology*. World Scientific, New Jersey: 45–64.

Chen L, Y. Wang, & M. Zhao. 2006. *In vitro* induction and characterization of tetraploid *Lychnis senno* Siebold et Zucc. *Horticultural Science* 41(3):759–761.

Chen, W.H., C.Y. Tang, and Y.L. Kao. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98:229–238.

Manton, I. 1950. *Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta*. Cambridge. The University Press.

Dhooghe, E, K. van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, and J. van Huylbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104:359–373.

Djafarer, R. 2008. *Phalaenopsis spesies: Jenis dan potensi untuk silangan*. Penebar Swadaya, Depok.

- Gantait, S., N. Mandal, S. Bhattacharyya, and P. K. Das. 2011. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 485–493.
- Griesbach, R.J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. *The Journal of Heredity* 76: 74–75.
- Grouh, M.S.H., H. Meftahizade, N. Lotfi, V. Rahimi, and B. Baniyadi. 2011. Doubling the chromosome number of *Salvia hains* using colchicine: Evaluation of morphological traits of recovered plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(19): 4892–4898.
- Jadrná, P., O. Plavcová, and F. Kobza. 2010. Morphological changes in colchicine-treated *Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey greenhouse plants. *Horticultural Science (Prague)* 37 (1): 27–33.
- Kao, Y.Y., C.C. Lin, C.H. Huang, and Y.H. 2007. The cytogenetics of *Phalaenopsis* orchids. In: Chen, W.H. & H.H. Chen (eds). *Orchid Biotechnology*. World Scientific, New Jersey: 115–128.
- Liu, G., Z. Li, and M. Bao. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica* 157:145–154.
- Miguel, T.P. and K.W. Leonhardt. 2011. *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin. *Scientia Horticulturae* 130: 314–319.
- Omidbaigi, R., M. Mirzaee, M.E. Hassani, and M.S. Moghadam. 2010a. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production* 4(2): 87–98.
- Omidbaigi, R., S. Yavari, M.E. Hassani, and S. Yavari. 2010b. Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 18(1): 23–35.
- Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantivivat, and M. Nanakorn. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. *European Journal of Horticultural Science* 75:123–127.
- Sastrosumarjo, S. dan M. Syukur. 2013. Perilaku kromosom. Di dalam: Syukur, M. dan S. Sastrosumarjo (eds). *Sitogenetika Tanaman*. IPB Press, Bogor: 65–87.
- Song, C., Liu S.J., Xiao, J., He, W.G., Zhou, Y., Qin, Q.B., Zhang, C., Liu, Y. 2012. Polyploid organisms. *Science China Life Sciences* 55: 301–311.
- Sulistianingsih, R., Z.A. Suyanto, dan A.E. Noer. 2004. Peningkatan kualitas angrek *Dendrobium* hibrida dengan pemberian kolkhisin. *Ilmu Pertanian* 11 (1): 13–21.
- Sweet, H.R. 1980. *The genus Phalaenopsis*. Day Printing Corp., Pomona, California. 124 hlm.
- Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1984. Chromosome in orchids: Counting and numbers. In: Arditti, J., (eds). *Orchid Biology: Reviews and perspectives, III*. Cornell University Press, London: 324–397.
- Tang, C.Y., and W.H. Chen. 2007. Breeding and development of new varieties in *Phalaenopsis*. In: Chen, W.H. & H.H. Chen (Eds.). *Orchid Biotechnology*. World Scientific, New Jersey: 1–22.
- Ye, Y.M., J. Tong, X.P. Shi, W. Yuan, and G.R. Li. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). *Scientia Horticulturae* 124: 95–101.
- Zeng, S.H., C.W. Chen, L. Hong, J.H. Liu, and X.X. Deng. 2006. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:85–93.