

Induksi Poliploidi *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume dan *Phalaenopsis amboinensis* J. J. Smith dengan Kolkisin dalam Kultur *In Vitro*

Polyploid Induction of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume and *Phalaenopsis amboinensis* J. J. Smith by Colchicine in In Vitro Culture

Eka Martha Della Rahayu¹, Dewi Sukma^{2*}, Muhamad Syukur², dan Irawati¹

¹Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor - LIPI, Jl. Ir. H. Juanda No. 13, Bogor, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 10 April 2015/Disetujui 2 November 2015

ABSTRACT

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume and *Phalaenopsis amboinensis* J.J. Smith (diploid) are important in *Phalaenopsis* breeding. Polyploid species are needed for crossing with polyploid hybrid varieties of *Phalaenopsis*. The objectives of this study were to obtain effective concentration of colchicine to induce polyploidy and to produce polyploid plantlets of *P. amabilis* and *P. amboinensis*. Experiment was arranged in randomized complete block design with one factor, the colchicine concentration. Protocorms of *P. amabilis* and *P. amboinensis* were immersed in half strength of Murashige-Skoog (1/2 MS) liquid media added with colchicine (0; 0.5; 5; 25; 50, and 75 mg L⁻¹) for 10 days. The results showed that higher concentration of colchicine on both species did not have significant effect on the survival of the plantlets at 24 weeks after treatment. The average number of leaves and roots of colchicine treated plantlets from both species were less than the control plantlets. Immersing protocorm in colchicine at concentration of 50 mg L⁻¹ for 10 days was effective in inducing polyploid plantlets of *P. amabilis* and *P. amboinensis* with the frequency of 33.3% and 40%, respectively. Polyploid plantlet has larger stomata size and lower stomata density than the diploid ones.

Keywords: chromosome number, colchicine, polyploid, protocorm, stomatal density, stomatal size

ABSTRAK

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume dan *Phalaenopsis amboinensis* J.J. Smith (diploid) banyak digunakan sebagai tetua dalam pemuliaan *Phalaenopsis*. Spesies dengan karakter poliploid dibutuhkan untuk persilangan dengan varietas hibrid yang bersifat poliploid. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh konsentrasi kolkisin yang efektif untuk induksi poliploidi serta untuk memperoleh planlet *P. amabilis* dan *P. amboinensis* poliploid. Percobaan disusun dalam rancangan kelompok lengkap teracak dengan satu faktor, yaitu konsentrasi kolkisin. Protokorm *P. amabilis* dan *P. amboinensis* direndam dalam media cair Murashige-Skoog setengah konsentrasi (1/2 MS) dengan penambahan kolkisin (0; 0.5; 5; 25; 50, dan 75 mg L⁻¹) selama 10 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi kolkisin yang semakin tinggi pada kedua jenis anggrek tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap persentase hidup planlet pada 24 minggu setelah perlakuan (24 MSP). Rata-rata jumlah daun dan akar planlet yang berasal dari protokorm yang diberi perlakuan kolkisin lebih rendah dibandingkan planlet kontrol. Perendaman protokorm dalam larutan kolkisin 50 mg L⁻¹ selama 10 hari efektif untuk menginduksi planlet *P. amabilis* poliploid dengan keberhasilan 33.3% dan *P. amboinensis* poliploid dengan keberhasilan 40%. Planlet poliploid memiliki ukuran stomata lebih besar dan kerapatan stomata lebih rendah dibandingkan dengan planlet diploid.

Kata kunci: jumlah kromosom, kerapatan stomata, kolkisin, poliploid, protokorm, ukuran stomata

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki 25 spesies anggrek bulan dengan 10 spesies di antaranya adalah endemik Indonesia (Christenson, 2001). Anggrek bulan memiliki berbagai

variasi bentuk, warna, dan ukuran bunga. Oleh karena itu, anggrek bulan menjadi salah satu komoditi hias yang sangat populer. Selain itu, anggrek bulan juga berpotensi sebagai induk dalam pemuliaan untuk menghasilkan berbagai anggrek bulan hibrida baru (Tang dan Chen, 2007).

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume dan *Phalaenopsis amboinensis* J.J. Smith banyak digunakan sebagai tetua dalam pemuliaan *Phalaenopsis*. *Phalaenopsis amabilis*

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: dsukma70@yahoo.com

mewariskan sifat bunga berukuran besar dan berwarna putih sedangkan *P. amboinensis* berpotensi untuk menghasilkan warna kuning, bintik coklat, tangkai bunga tegak, serta aroma yang khas (Tang dan Chen, 2007).

Kromosom dasar dari spesies-spesies anggrek *Phalaenopsis* adalah diploid ($2n=2x=38$) (Lin *et al.*, 2001), sementara sebagian besar varietas komersial atau hibrida adalah tetraploid (Chen *et al.*, 2011). Persilangan antara spesies dengan hibrida tetraploid menunjukkan adanya hambatan dalam pembentukan biji, terutama jika tanaman tetraploid digunakan sebagai donor polen dan tanaman diploid sebagai betina (Tang dan Chen, 2007). Oleh karena itu, dalam upaya melakukan persilangan antara spesies diploid dengan hibrida tetraploid, diperlukan upaya peningkatan ploidi dari spesies diploid.

Tang dan Chen (2007) menyatakan bahwa klon superior dari *Phalaenopsis* Taisuco berbunga putih besar pertama kali dikembangkan melalui perbaikan genetik *Phalaenopsis* Doris melalui penggantian kromosom, sehingga dihasilkan kapasitas genomik yang lebih besar untuk mengakumulasi lebih banyak alel. Tanaman tetraploid yang dihasilkan selanjutnya disilangbalik atau disilang dengan kerabatnya untuk mengakumulasi alel-alel aditif untuk ukuran bunga dan karakter lainnya sehingga telah dihasilkan lebih dari 30 *Phalaenopsis* Taisuco unggul. Poliploidi dapat meningkatkan keragaman genetik, menghasilkan ukuran bunga yang lebih besar, bentuk bunga yang lebih bulat dan warna bunga yang lebih pekat (Miguel dan Leonhardt, 2011).

Pemuliaan tanaman dengan induksi mutasi merupakan metode alternatif untuk pemuliaan konvensional, dapat dilakukan dengan mutagen fisik dan kimia (van Harten 1998). Induksi mutasi dengan mutagen fisik iradiasi sinar gamma pada tanaman hias antara lain telah dilaporkan pada krisan oleh Aisyah *et al.* (2009) dan anggrek *Spathoglottis plicata* oleh Romeida *et al.* (2012). Mutasi kimia dengan tujuan menghasilkan tanaman poliploid, yaitu tanaman yang memiliki tiga set kromosom atau lebih, umumnya menggunakan kolkisin (Dhooghe *et al.*, 2011).

Kolkisin telah digunakan secara *in vitro* untuk menghasilkan tanaman poliploid pada berbagai spesies anggrek seperti *Phalaenopsis* (Griesbach, 1981 dan 1985), *Cattleya intermedia* Lindl. (Silva *et al.*, 2000), *Dendrobium secundum* (Blume) Lindl. (Atichart dan Bunnag, 2007), *Dendrobium scabrilingue* L. (Sarathum *et al.*, 2010), dan *Rhyncostylis gigantea* var. *rubrum* (Kerdsuwan dan Techato, 2012).

Griesbach (1981) melakukan induksi poliploidi pada protokorm *Phalaenopsis equestris*, *Phalaneopsis fasciata*, dan *Phalaenopsis* Betty Hausermann menggunakan 50 mg L⁻¹ kolkisin serta perendaman selama 10 hari. Penelitian tersebut menghasilkan 50% protokorm yang kemudian berkembang menjadi tanaman tetraploid. Penambahan 0.5 mg L⁻¹ kolkisin ke dalam media kultur dapat menghasilkan *Phalaenopsis* Golden Sands 'Canary' heksaploid (Griesbach, 1985). Perendaman protokorm *D. secundum* dalam kolkisin 500 mg L⁻¹ selama 1 hari menghasilkan tanaman poliploid tertinggi (Atichart dan Bunnag, 2007). Planlet *D. scabrilingue* tetraploid dihasilkan dari perendaman protokorm dalam

kolkisin 750 mg L⁻¹ selama 14 hari (Sarathum *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2000) melaporkan bahwa perendaman protokorm *C. intermedia* dalam kolkisin 500 dan 1,000 mg L⁻¹ selama 4 hari dapat menghasilkan tanaman tetraploid. Tanaman *R. gigantea* var. *rubrum* tetraploid dihasilkan dari perendaman protokorm dalam kolkisin 2,000 mg L⁻¹ selama 3 hari.

Salah satu usaha yang dapat dilakukan untuk pemuliaan *P. amabilis* dan *P. amboinensis* adalah dengan melakukan induksi poliploidi secara *in vitro*. Konsentrasi kolkisin optimum untuk induksi poliploidi kedua spesies anggrek tersebut belum diketahui. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan konsentrasi kolkisin efektif (sekurangnya 30% planlet poliploid) dalam induksi poliploidi pada protokorm *P. amabilis* dan *P. amboinensis*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Treub Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (PKT KRB-LIPI) sejak bulan November 2012 sampai dengan Oktober 2013. Rancangan percobaan adalah rancangan kelompok lengkap teracak dengan satu faktor, yaitu konsentrasi kolkisin. Konsentrasi kolkisin yang diujikan adalah 0; 0.5; 5; 25; 50 dan 75 mg L⁻¹. Larutan kolkisin sesuai dengan perlakuan yang telah disterilisasi dengan *millipore filter* 0.2 µm, dimasukkan ke dalam media cair Murashige-Skoog setengah konsentrasi (1/2MS) steril dengan volume total untuk setiap perlakuan adalah 25 mL. Protokorm *P. amabilis* dan *P. amboinensis* yang berumur 10 bulan dari semai biji, direndam dalam larutan kolkisin selama 10 hari dalam erlenmeyer dan diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan rotasi 50 rpm. Setelah perendaman, protokorm dibilas tiga kali dengan akuades steril lalu disubkultur pada media pemulihan yaitu media 1/2MS yang ditambahkan 30 g L⁻¹ gula, 2.02 g L⁻¹ gelrite, 0.3 mg L⁻¹ NAA, 2 g L⁻¹ arang aktif, dan 2 g L⁻¹ pepton selama 8 minggu setelah perlakuan (MSP). Selanjutnya protokorm disubkultur pada media pembesaran, yaitu media 1/2MS yang ditambahkan 30 g L⁻¹ gula, 2.02 g L⁻¹ gelrite, 100 g L⁻¹ pisang ambon masak yang dihaluskan dengan *blender* dan 2 g L⁻¹ arang aktif. Protokorm diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 23-25 °C dengan fotoperiodisitas 12 jam terang dan 12 jam gelap.

Setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali. Satu ulangan terdiri atas tiga protokorm yang ditanam dalam satu botol kultur. Peubah yang diamati adalah persentase hidup, jumlah daun, akar, dan *protocorm like body* (plb) selama 24 MSP. Setelah 24 MSP, berdasarkan pengamatan visual morfologi, planlet dengan morfologi abnormal (daun tebal dan planlet pendek) dipilih untuk dilakukan analisis stomata dan kromosom.

Analisis stomata dilakukan dengan metode Gantait *et al.* (2011) yang dimodifikasi. Daun dari internodus teratas yang telah membuka sempurna diambil di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF). Permukaan atas daun dikerik dengan pisau silet di luar LAF, sampai tersisa lapisan epidermis bawah. Lapisan epidermis dipotong, lalu

diletakkan di atas kaca objek. Larutan gliserin diteteskan di atas potongan epidermis, lalu 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 mm². Sepuluh stomata lalu dipilih secara acak untuk diukur panjang dan lebarnya menggunakan piranti lunak Optika Vision Lite 2.1.

Analisis kromosom dilakukan menggunakan metode Manton (1950) yang dimodifikasi. Ujung akar aktif dipotong sekitar 1 cm, lalu difiksasi dalam larutan hidroksiquinolin selama 24 jam pada suhu 4 °C. Akar lalu 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 lalu diletakkan pada gelas arloji. Akar kemudian dipindahkan pada gelas preparat. Bagian ujung akar dipotong 1-2 mm, lalu diteteskan orcein secukupnya kemudian pasang kaca penutup. Selanjutnya preparat diketuk-ketuk dan dipanaskan sekitar 5 detik. Preparat lalu dibiarkan dingin kemudian ditekan halus dan dipanaskan lagi sekitar 5 detik. 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 pada tiga sel dari setiap preparat yang dianalisis.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam. Apabila terdapat data dengan keragaman tinggi dan ragam tidak homogen maka dilakukan transformasi 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. Untuk mengetahui adanya perbedaan antara ukuran dan kerapatan stomata planlet diploid serta poliploid digunakan uji-t pada taraf nyata 1%. Pengolahan data menggunakan program SAS 9.1.3 Portable.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi poliploidi pada protokorm *P. amabilis* dan *P. amboinensis* menggunakan kolkisin pada konsentrasi dan lama perendaman yang diujikan tidak berpengaruh nyata terhadap persentase hidup dan rata-rata jumlah plb, namun berpengaruh nyata terhadap rata-rata jumlah daun dan akar pada 24 MSP (Tabel 1). Persentase hidup kedua spesies anggrek tersebut berkisar dari 80-100% (Tabel 1). Persentase hidup protokorm setelah perlakuan kolkisin pada kedua spesies yang relatif tinggi menunjukkan bahwa konsentrasi yang diujikan tidak mematikan sel atau jaringan pada protokorm.

Protokorm dapat tumbuh menghasilkan *protocorm like body* (plb) dan berkembang menjadi planlet dalam 24 MSP. Jumlah daun dan akar pada planlet dari kedua spesies anggrek yang diberi perlakuan kolkisin tampak lebih rendah daripada kontrol (Tabel 1). Keragamaan planlet *P. amabilis* dan *P. amboinensis* yang dihasilkan dari protokorm yang diberi perlakuan kolkisin menunjukkan morfologi yang abnormal, terlihat dari daun baru yang tumbuh menebal dan planlet menjadi pendek atau roset. Persentase planlet yang menunjukkan morfologi daun menebal sebesar 46-84%

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

Spesies	Konsentrasi kolkisin (mg L ⁻¹)	Persentase hidup (%)	Rata-rata jumlah daun	Rata-rata jumlah akar	Rata-rata jumlah plb
<i>P. amabilis</i>	0.0	100.0	3.6(2.1)a	3.1(2.0)a	7.3(2.7)
	0.5	100.0	1.5(1.6)b	1.1(1.4)b	7.3(2.8)
	5.0	86.8	1.7(1.6)b	1.3(1.5)b	9.1(3.1)
	25.0	86.8	1.8(1.7)b	1.5(1.6)b	3.8(2.2)
	50.0	93.4	1.8(1.7)b	1.1(1.4)b	6.5(2.6)
	75.0	86.8	1.5(1.6)b	1.2(1.5)b	3.4(2.0)
<i>P. amboinensis</i>	0.0	100.0	3.1a	2.4a	1.9(1.7)ab
	0.5	100.0	2.0b	1.3bc	0.9(1.3)b
	5.0	86.8	1.4b	0.9c	2.9(1.8)ab
	25.0	93.4	2.3ab	1.6b	0.5(1.2)b
	50.0	80.0	2.3ab	1.6b	4.2(2.2)a
	75.0	93.4	2.1b	1.9ab	1.6(1.5)ab

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama pada masing-masing spesies menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%. Angka di dalam tanda kurung adalah hasil transformasi menggunakan rumus $\sqrt{x + 1}$

Tabel 2. Persentase planlet *Phalaenopsis amabilis* dan *Phalaenopsis amboinensis* dengan daun tebal dan planlet poliploid

Spesies	Konsentrasi kolkisin (mg L ⁻¹)	Persentase planlet dengan daun tebal (%) ^x	Persentase planlet poliploid (%) ^y
<i>P. amabilis</i>	0.0	0.0 (0/15)	0.0 (0/0)
	0.5	46.7 (7/15)	0.0 (0/7)
	5.0	53.9 (7/13)	0.0 (0/7)
	25.0	61.5 (8/13)	12.5 (1/8)
	50.0	42.9 (6/14)	33.3 (2/6)
	75.0	84.6 (11/13)	18.2 (2/11)
<i>P. amboinensis</i>	0.0	0.0 (0/15)	0.0 (0/0)
	0.5	26.7 (4/15)	0.0 (0/4)
	5.0	30.8 (4/13)	0.0 (0/4)
	25.0	35.7 (5/14)	0.0 (0/5)
	50.0	41.7 (5/12)	40.0 (2/5)
	75.0	57.1 (8/14)	25.0 (2/8)

Keterangan: ^xJumlah planlet dengan daun tebal/jumlah planlet yang hidup pada 24 MSP ^yJumlah planlet poliploid/jumlah planlet dengan daun tebal

pada *P. amabilis* dan 26-57% pada *P. amboinensis* (Tabel 2). Semakin tinggi konsentrasi kolkisin yang diujikan, persentase planlet dengan daun menebal juga semakin tinggi.

Pertumbuhan yang lambat dan morfologi abnormal merupakan gejala yang umum terjadi setelah perlakuan kolkisin pada tanaman. Griesbach (1981) menemukan bahwa pertumbuhan *Phalaenopsis* yang diberi perlakuan kolkisin lebih lambat daripada planlet kontrol. Pertumbuhan yang lebih lambat tersebut diduga disebabkan oleh penetrasi dari kolkisin ke dalam lapisan sel apikal sehingga mempengaruhi pembelahan sel (Thao *et al.*, 2003; Sarathum *et al.*, 2010; Gantait *et al.*, 2011). Morfologi yang abnormal juga dilaporkan oleh Zeng *et al.* (2006), dimana kolkisin dapat menimbulkan efek samping, yaitu morfologi abnormal seperti penebalan daun selama proses mutagenesis. Penebalan daun tanaman tetraploid ditemukan pada *Caladium* 'Tapestry' (Cai *et al.*, 2015) dan *Thymus persicus* (Tavan *et al.*, 2015).

Planlet *P. amabilis* dan *P. amboinensis* yang memiliki daun baru yang menebal, berwarna lebih hijau, serta planlet berukuran pendek diduga bersifat poliploid. Jaringan poliploid diduga mengandung lebih banyak klorofil sehingga warna daun terlihat lebih hijau. Kandungan klorofil yang tinggi terdapat pada tanaman *Paulownia tomentosa* (Thunb.) tetraploid (Tang *et al.*, 2010) dan semangka poliploid (Pradeepkumar, 2011). Analisis stomata juga merupakan salah satu cara untuk seleksi awal tanaman poliploid dan untuk mengurangi ukuran populasi yang dipertahankan setelah tahap kultur *in vitro* (Silva *et al.*, 2000; Miguel dan Leonhardt, 2011). Chen *et al.* (2009) serta Miguel dan Leonhardt (2011) telah menggunakan analisis stomata untuk menentukan tingkat ploidi pada anggrek *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Odontioda* dan *Phalaenopsis*. Namun cara yang paling baik untuk

memastikan tingkat ploidi tanaman hasil perlakuan kolkisin adalah dengan analisis jumlah kromosom.

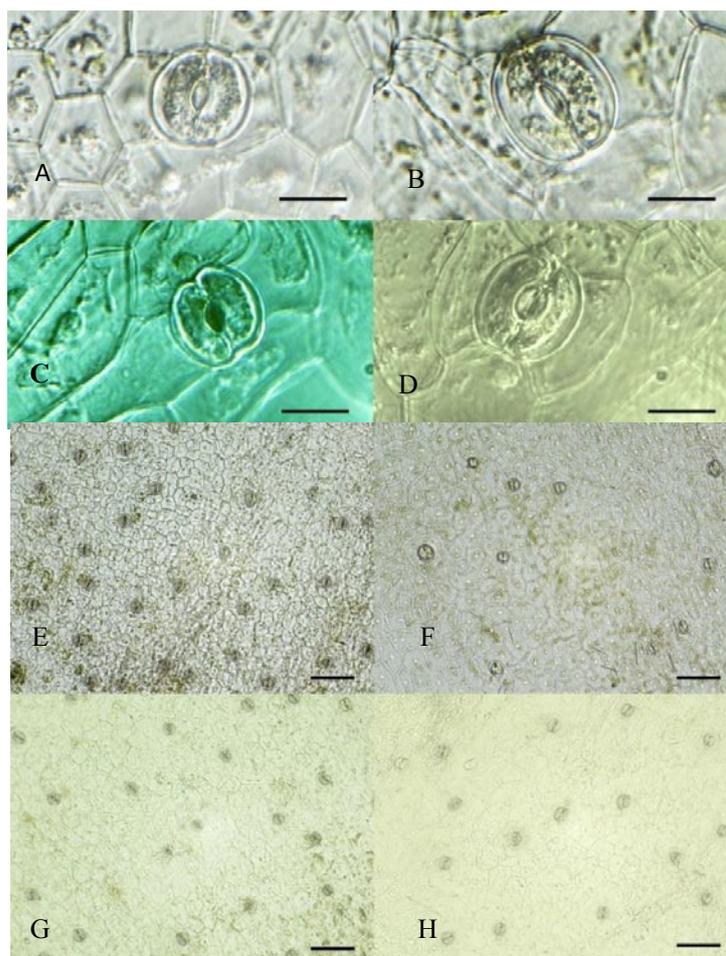
Hasil analisis stomata dari planlet yang diduga poliploid berdasarkan morfologi tanaman disajikan pada Tabel 3 dan morfologi serta kerapatan stomata disajikan pada Gambar 1. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan kolkisin 50 dan 75 mg L⁻¹ berpengaruh nyata terhadap panjang dan kerapatan stomata *P. amabilis* dan *P. amboinensis* (Tabel 3). Kedua perlakuan tersebut menghasilkan planlet *P. amabilis* dan *P. amboinensis* yang memiliki stomata lebih panjang dari kontrol. 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 diduga perlakuan kolkisin 50 dan 75 mg L⁻¹ dapat menginduksi terbentuknya tanaman poliploid untuk kedua spesies. Berdasarkan hasil analisis kromosom pada planlet *P. amabilis* dan *P. amboinensis*, ditemukan beberapa planlet dengan sel yang poliploid seperti terlihat pada Tabel 2 dan Gambar 2.

Phalaenopsis amabilis dan *P. amboinensis* memiliki jumlah kromosom yang sama, yaitu 2n=2x=38 (Kao *et al.* 2007). Berdasarkan Tabel 2 terlihat bahwa hasil pengamatan morfologi berbeda dengan hasil analisis kromosom. Planlet dengan daun tebal yang diduga poliploid ternyata tidak semuanya terbukti poliploid setelah dilakukan analisis kromosom. Hal yang sama dilaporkan Zeng *et al.* (2006) pada *Citrus* yang diberi perlakuan kolkisin, awalnya 50% sel menjadi tetraploid, namun satu bulan setelah perlakuan kolkisin, hanya 16.7% sel yang tetap tetraploid. Hal tersebut dapat disebabkan oleh sebagian besar sel yang diidentifikasi sebagai tetraploid setelah perlakuan kolkisin mengalami kematian dalam kultur *in vitro* atau sel-sel tetraploid menunjukkan kemampuan pertumbuhan yang lebih rendah jika dibandingkan sel-sel diploid.

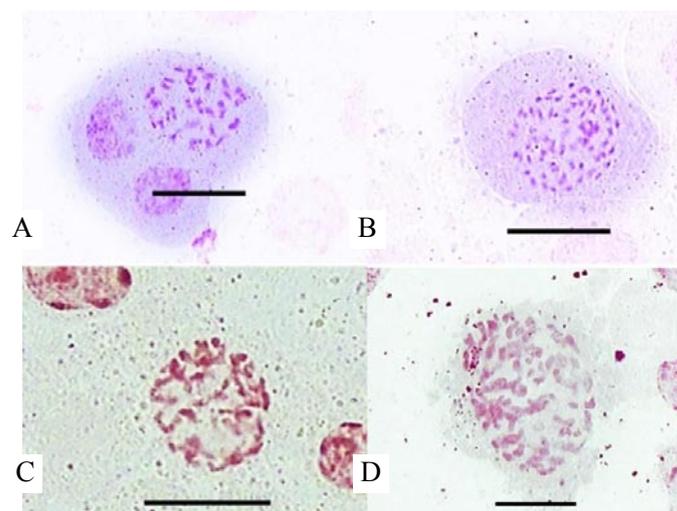
Tabel 3. Pengaruh perendaman protokorm dalam larutan kolkisin terhadap ukuran dan kerapatan stomata planlet *Phalaenopsis amabilis* dan *Phalaenopsis amboinensis*

Spesies	Kolkisin (mg L ⁻¹)	Panjang stomata (µm)	Lebar stomata (µm)	Kerapatan stomata (jumlah/3.79 mm ²)
<i>P. amabilis</i>	0.0	30.2b	30.3ab	9.4a
	0.5	29.8b	29.2b	10.1a
	5.0	30.2b	29.0b	9.0a
	25.0	31.4b	31.2ab	9.0a
	50.0	36.1a	32.6a	6.1b
	75.0	36.5a	29.6b	5.7b
<i>P. amboinensis</i>	0.0	26.3bc	26.3bc	10.5a
	0.5	27.0b	26.5bc	8.8b
	5.0	24.7c	23.8d	10.0a
	25.0	24.7c	24.6cd	9.4ab
	50.0	31.3a	29.1a	6.0c
	75.0	30.7a	26.8b	6.6c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama pada masing-masing spesies menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%



Gambar 1. Ukuran dan kerapatan stomata *Phalaenopsis amabilis* dan *Phalaenopsis amboinensis* setelah perendaman protokorm dalam larutan kolkisin. *Phalaenopsis amabilis* diploid (A) dan poliploid (B) serta *P. amboinensis* diploid (C), dan poliploid (D) dengan perbesaran 400x, bar = 30 µm. Kerapatan stomata *P. amabilis* diploid (E), poliploid (F) serta *P. amboinensis* diploid (G), dan poliploid (H) dengan perbesaran 100x, bar = 100 µm



Gambar 2. Kromosom *Phalaenopsis amabilis* dan *Phalaenopsis amboinensis* setelah perendaman protokorm dalam larutan kolkisin. Kromosom *P. amabilis* diploid (A) dan poliploid (B) serta kromosom *P. amboinensis* diploid (C) dan poliploid (D). Perbesaran 1000x, bar = 20 µm

Perendaman protokorm dalam larutan kolkisin 50 mg L⁻¹ selama 10 hari efektif untuk menginduksi pembentukan planlet *P. amabilis* poliploid dengan persentase 33.3% dan *P. amboinensis* poliploid dengan persentase 40% dari planlet yang memiliki daun menebal (Tabel 2). Planlet *P. amabilis* poliploid yang dihasilkan memiliki 70-76 kromosom, sedangkan planlet *P. amboinensis* memiliki 72-76 kromosom (Tabel 4). Kromosom *P. amabilis* serta *P. amboinensis* diploid dan poliploid dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil uji-t menunjukkan bahwa ukuran dan kerapatan stomata planlet *P. amabilis* dan *P. amboinensis* poliploid berbeda nyata dengan planlet diploid (Tabel 4). Planlet *P. amabilis* dan *P. amboinensis* poliploid, memiliki ukuran stomata yang lebih besar dari tanaman diploid [Gambar 1 (A, B, C, D)] sehingga memiliki rata-rata kerapatan stomata lebih rendah daripada tanaman diploid [Gambar 1(E, F, G, H)]. Hasil penelitian yang diperoleh sejalan dengan hasil penelitian induksi poliploiditas pada anggrek *C. intermedia*

(Silva *et al.*, 2000), *Anthurium andraeanum* “Arizona” (Chen *et al.*, 2011), *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Odontioda*, *Phalaenopsis* (Miguel dan Leonhardt, 2011), serta *R. retusa* var. *rubrum* (Kerdsuwan dan Te-chato, 2012).

Planlet *P. amabilis* dan *P. amboinensis* tetraploid yang dihasilkan masih perlu dilakukan evaluasi kecepatan pertumbuhan dan morfologi bunganya. Program pemuliaan untuk *Phalaenopsis* tetraploid dapat melalui persilangan dengan varietas hibrida tetraploid ataupun melalui persilangan dengan spesies atau hibrida diploid untuk menghasilkan tanaman triploid. Menurut Syukur (2013), tanaman triploid umumnya steril karena cara berpasangan yang tidak seimbang pada waktu meiosis. Kondisi tersebut dapat bermanfaat pada pemuliaan *Phalaenopsis* karena dapat dihasilkan hibrida-hibrida dengan *vase life* tinggi sehingga bunga tahan lebih lama. Pendekatan lain dalam aplikasi tanaman tetraploid untuk pemuliaan tanaman adalah penyerbukan untuk menghasilkan populasi *selfing* tetraploid dengan individu yang beragam.

Tabel 4. Rata-rata jumlah kromosom planlet diploid dan poliploid serta ukuran dan kerapatan stomata planlet diploid dan poliploid setelah perendaman protokorm *Phalaenopsis amabilis* dan *Phalaenopsis amboinensis* dalam larutan kolkisin

Spesies	Planlet	Rata-rata jumlah kromosom	Rata-rata panjang stomata (µm)	Rata-rata lebar stomata (µm)	Rata-rata kerapatan stomata (jumlah/3.79 mm ²)
<i>P. amabilis</i>	Diploid	36.7 ± 1.5	29.3b	28.2b	8.9a
	Poliploid	73.2 ± 2.6	37.9a	32.7a	4.9b
<i>P. amboinensis</i>	Diploid	36.6 ± 1.6	25.4b	25.0b	9.4a
	Poliploid	74.0 ± 1.9	34.8a	30.4a	5.6b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama pada masing-masing spesies menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji-t pada taraf 1%

KESIMPULAN

Perlakuan perendaman protokorm *P. amabilis* dan *P. amboinensis* dalam larutan kolkisin 50 dan 75 mg L⁻¹ selama 10 hari dapat menghasilkan planlet dengan panjang stomata lebih besar 1.25x dari panjang stomata planlet kontrol. Ukuran stomata planlet poliploid lebih besar daripada planlet diploid, tetapi kerapatan stomata planlet poliploid lebih rendah daripada kerapatan stomata planlet diploid. Hasil analisis kromosom membuktikan bahwa perendaman protokorm kedua spesies anggrek tersebut dalam larutan kolkisin 50 mg L⁻¹ selama 10 hari menghasilkan persentase planlet poliploid paling tinggi yaitu 33.3% pada *P. amabilis* dan 40% pada *P. amboinensis* dari planlet yang menunjukkan morfologi daun menebal.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, S.I., H. Aswidinnoor, A. Saefuddin, B. Marwoto, S. Sastrosumarjo. 2009. Induksi mutasi pada stek pucuk anyelir (*Dianthus caryophyllus* Linn.) melalui iradiasi sinar gamma. J. Agron. Indonesia 37:62-70.
- Atichart, P., S. Bunnag. 2007. Polyploid induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. by *in vitro* techniques. Thai J. Agric. Sci. 40:91-95.
- Cai, X., Z. Cao, S. Xu, Z. Deng. 2015. Induction, regeneration and characterization of tetraploids and variants in 'Tapestry' caladium. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 120:689-700.
- Chen, C., X. Hou, X. Zhang, G. Wang, L. Tian. 2011. Induction of *Anthurium andraeanum* "Arizona" tetraploid by colchicine *in vitro*. Euphytica 181:137-145.
- Chen, W.H., C.Y. Tang, Y.L. Kao. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 98:229-238.
- Christenson, E.A. 2001. *Phalaenopsis*: a monograph. Timber Press, Oregon.
- Dhooghe, E., K. van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, J. van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 104:359-373.
- Gantait, S., N. Mandal, S. Bhattacharyya, P.K. Das. 2011. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 106:485-493.
- Griesbach, R.J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 1:103-107.
- Griesbach, R.J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. The Journal of Heredity 76:74-75.
- Kao, Y.Y., C.C. Lin, C.H. Huang, Y.H. Li. 2007. The cytogenetics of *Phalaenopsis* orchids. p. 115-128. In W.H. Chen, H.H. Chen (Eds.). Orchid Biotechnology. World Scientific, New Jersey.
- Kerdsuwan, N., S. Te-chato. 2012. Effects of colchicine on survival rate, morphological, physiological and cytological characters of Chang Daeng orchid (*Rhyncostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) *in vitro*. J. Agric. Technol. 8:1451-1460.
- Lin, S., H.C. Lee, W.H. Chen, C.C. Chen, Y.Y. Kao, Y.M. Fu, Y.H. Chen, T.Y. Lin. 2001. Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126:195-199.
- Manton, I. 1950. Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta. The University Press, Cambridge.
- Miguel, T.P., K.W. Leonhardt. 2011. *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin. Sci. Hort. 130:314-319.
- Pradeepkumar, T. 2011. Characterization of M1 generation of polyploid in watermelon variety 'Sugar Baby'. Cucurbit Genetics Cooperative Report 33-34:44-46.
- Romeida, A., S.H. Sutjahjo, A. Purwito, D. Sukma, Rustikawati. 2012. Variasi genetik mutan anggrek *Spathoglottis plicata* Blume berdasarkan marker ISSR. J. Agron. Indonesia 40:218-224.
- Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantivivat, M. Nanakorn. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Europ. J. Hort. Sci. 75:123-127.
- Silva, P.A.K.X., S. Callegari-Jacques, M.H. Bodanese-Zanettini. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciência Rural 30:105-111.
- Syukur, M. 2013. Variasi jumlah kromosom. hal. 127-151. Dalam M. Syukur, S. Sastrosumarjo (Eds.). Sitogenetika Tanaman. IPB Press, Bogor.
- Tang, C.Y., W.H. Chen. 2007. Breeding and development of new varieties in *Phalaenopsis*. p. 1-22. In W.H. Chen, H.H. Chen (Eds.). Orchid Biotechnology. World Scientific, New Jersey.

- Tang, Z.Q., D.L. Chen, Z.J. Song, Y.C. He, D.T. Cai. 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell Tiss Organ Cult 102:213-220.
- Tavan, M., M.H. Mirjalili, G. Karimzadeh. 2015. *In vitro* polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). Plant Cell Tiss Organ Cult. 122:573-583.
- Thao, N.T.P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki, H. Okubo. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 72:19-25.
- van Harten, A.M. 1998. Mutation Breeding, Theory and Practical Applications. Cambridge University Press, Cambridge.
- Zeng, S.H., C.W. Chen, L. Hong, J.H. Liu, X.X. Deng. 2006. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 87:85-93.