

Mutasi Induksi *Dendrobium sylvanum* var. *flava* Menggunakan Kolkisin secara *In Vitro*

In Vitro Induction Mutation of *Dendrobium sylvanum* var. *Flava* Using Colchicine

Musalamah^{1*}, Ni Made Armini Wiendi², dan Sri Rianawati³

Diterima 30 Agustus 2017/Disetujui 28 Februari 2018

ABSTRACT

In Vitro mutation using colchicine on 2 month of self-pollinated protocorm like bodies of *Dendrobium sylvanum* var. *flava* was conducted to determine the effects of concentration and immersion duration in colchicine on proliferation of PLBs, and to identify of ploidy variants based on stomatal variable. Research was arranged using factorial completely randomized design with three factors in three replications. The first factor was concentration of colchicine, consisted of five concentrations (0.02; 0.04, 0.06; 0.08; dan 0.1%). The second factor was duration of immersion in the colchicine, consisted of four durations (1; 24; 48; 72 hours). The third factor was proliferation medium consisted of two concentrations of BAP (1; 0.5 mg L⁻¹). Analysis of variance showed the significant effect of colchicine treatment on percentage of survived explants. LD₅₀ in media 1 mg L⁻¹ BAP was obtained at a colchicine concentration of 0.069% with duration immersion of 58.19 hours. On Media 0.5 mg L⁻¹ BAP, LD₅₀ was obtained at colchicine concentration of 0.054% with duration immersion of 47.63 hours. Percentage of solid polyploid mutant of *Dendrobium sylvanum* var. *flava* can not be determined on MV2 generation because the stomata leaf showed chimeras based on the chloroplast number in cell guard and stomata size.

Keywords: colchicines, *Dendrobium sylvanum*, mutation, number of chloroplast stomatal density.

ABSTRAK

Mutasi dengan kolkisin pada PLBs hasil selfing *Dendrobium sylvanum* var. *flava* umur 2 bulan dilakukan secara *In Vitro* dengan tujuan mempelajari pengaruh konsentrasi kolkisin, durasi perendaman dalam kolkisin, media proliferasi terhadap pertumbuhan PLBs *Dendrobium sylvanum* var. *flava* serta mengidentifikasi variasi ploidi berdasarkan variabel stomata. Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Lengkap Faktorial 3 Faktor dengan 3 ulangan. Faktor pertama ialah konsentrasi kolkisin yang terdiri atas 5 taraf (0.02; 0.04, 0.06; 0.08; dan 0.1%). Faktor kedua ialah durasi perendaman yang terdiri atas 4 taraf (1; 24; 48; 72 jam). Faktor ketiga ialah media proliferasi media V&W yang ditambah BAP terdiri atas 2 taraf (1; 0.5 mg L⁻¹). Hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh kolkisin yang nyata terhadap variabel persentase hidup. LD₅₀ pada media 1 mg L⁻¹ BAP diperoleh pada konsentrasi 0.069 % dengan durasi perendaman 58.19 jam. Pada media 0.5 mg L⁻¹ BAP, LD₅₀ diperoleh pada konsentrasi 0.054 % dengan durasi perendaman 47.63 jam. Persentase mutan poliploid pada MV2 *Dendrobium sylvanum* var. *flava* ini belum dapat ditentukan karena stomata daunnya masih kimera berdasarkan karakter jumlah kloroplas sel penjaga dan ukuran stomata.

Kata kunci: *Dendrobium sylvanum*, jumlah kloroplas, kerapatan stomata, kolkisin, mutasi.

¹ Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor,

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

³ Balai Penelitian Tanaman Hias, Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian
Jl. Raya Ciherang, Segunung, Pacet, Ciherang, Cianjur 43252, Jawa Barat, Indonesia
Email: sasha_soma@yahoo.com (*Penulis korespondensi)

Dendrobium sylvanum var. *flava* ($2n=38$) merupakan salah satu anggrek spesies potensial sebagai bunga potong. *Dendrobium sylvanum* var. *flava* memiliki jumlah kuntum yang banyak yaitu 30-40 per tangkai, bertangkai panjang, dengan warna sepal petal yang unik yaitu kuning sementara pada umumnya *Dendrobium sylvanum* var. *flava* memiliki warna sepal petal coklat muda dengan garis coklat tua serta labellum berwarna putih (Pfahl, 2017). Namun demikian, *Dendrobium sylvanum* var. *flava* memiliki bunga berukuran kecil dan corollanya agak tipis. Salah satu upaya untuk memperbaiki ukuran bunganya agar lebih besar dengan corolla lebih tebal sehingga lebih sesuai untuk bunga potong ialah melalui pengandaan kromosom (poliploid). Menurut Hartati *et al.* (2014) salah satu kelebihan tanaman anggrek poliploid ialah memiliki ukuran bunga lebih besar dan ketahanan bunga lebih lama. Saat ini telah banyak dilaporkan pemanfaatan teknik pemuliaan tanaman poliploid menggunakan kolkisin (Griesbach, 1985; Silva *et al.*, 2000; Sulistianingsih *et al.*, 2004; Bautista, 2005; Li *et al.*, 2008; Sarathum *et al.*, 2010; Miguel dan Leonhardt, 2011; Tharawood *et al.*, 2012; Tiwari dan Mishra 2012; Yulianti *et al.*, 2015; Tuwo dan Indrianto 2016; He *et al.*, 2016; Atichart, 2013; Rahayu *et al.*, 2015)

Pada galur mutan generasi awal seringkali terjadi kimera pada sel-selnya. Untuk memisahkan sel-sel kimera tersebut maka masing-masing sel harus diperbanyak melalui sub kultur pada media proliferasi yang tepat. Untuk menghindari kimera, Geier (2012) menyarankan sistem regenerasi sel tunggal. Penggunaan zat pengatur sitokinin dan auksin baik secara tunggal atau dikombinasikan dilaporkan mampu memproliferasi sel-sel yang telah terpapar mutagen kolkisin (Atichart, 2013). Azmi dan Wiendi (2013) melaporkan penambahan 1 mg L⁻¹ BAP mampu menginduksi kalus dengan persentase tertinggi (48.61%) pada anggrek *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith.

Dalam banyak penelitian dilaporkan bahwa ploidi individu tanaman memiliki korelasi dengan karakter stomatanya. Adanya korelasi ukuran dan jumlah stomata terhadap individu poliploid tersebut menyebabkan analisis stomata ini juga sering digunakan dalam mengidentifikasi individu poliploid pada populasi diploidnya (Miguel dan Leonhardt,

2011; Tharawood *et al.*, 2012; Tiwari dan Mishra, 2012; Yulianti *et al.*, 2015; Rahayu *et al.*, 2015; Tuwo dan Indrianto, 2016; He *et al.*, 2016; Azmi *et al.*, 2016).

Konsentrasi optimum kolkisin pada anggrek pada umumnya berkisar antara 0.01 – 0.1%, sementara durasi perendaman tergantung pada eksplan dan metode yang digunakan (Suryo, 2007). Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh konsentrasi dan durasi perendaman kolkisin, media proliferasi, interaksinya terhadap pertumbuhan PLBs *Dendrobium sylvanum* var. *flava* serta mengidentifikasi variasi ploidi berdasarkan peubah stomata.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias Pasarminggu dan Laboratorium Mikroteknik Institut Pertanian Bogor dari bulan November 2015 sampai Maret 2017. Penelitian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap 3 faktor dengan 3 ulangan. Faktor pertama ialah konsentrasi kolkisin yaitu; 0.02% (K1); 0.04% (K2); 0.06 (K3); 0.08 (K4); dan 0.1% (K5). Faktor kedua ialah durasi perendaman kolkisin yaitu 1 jam (T1); 24 jam (T2); 48 jam (T3); dan 72 jam (T4). Faktor ketiga ialah media proliferasi yaitu media dasar Vacin and Went dengan 2 taraf BAP yaitu 1 mg L⁻¹ (M1); 0.5 mg L⁻¹ (M2). Media yang digunakan berupa media dasar Vacin and Went (V&W) + 50 ml L⁻¹ air kelapa + 20 g L⁻¹ sukrosa + 7 g L⁻¹ agar + 0.1 mg L⁻¹ IAA, dengan kontrol tanpa kolkisin. Eksplan yang digunakan adalah PLBs (*protocorm like bodies*) dari semaian biji anggrek *Dendrobium sylvanum* var. *flava* hasil *selfing* umur 2 bulan. PLBs direndam dalam media V&W yang ditambahkan kolkisin sesuai perlakuan dan diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm dengan durasi sesuai durasi perendaman. Setelah perendaman dalam kolkisin, PLBs ditanam pada media proliferasi, diletakkan pada ruang inkubasi suhu 25 °C dengan intensitas penyinaran 1000 lux dan lama penyinaran 24 jam/hari.

Peubah yang diamati pada 6 bulan setelah perlakuan kolkisin ialah persentase hidup dan persentase proliferasi. Data persentase hidup planlet diambil pada MV1. Perhitungan persentase hidup ialah jumlah

planlet yang bertahan hidup dibagi jumlah total planlet yang ditanam dikalikan seratus persen. Data persentase PLBs berproliferasi diambil pada MV1. Perhitungan persentase proliferasi ialah jumlah planlet yang berproliferasi dibagi jumlah total planlet yang ditanam dikalikan seratus persen. Peubah yang diamati pada 12 bulan setelah perlakuan kolkisin ialah jumlah tunas pada generasi MV2 dengan cara menghitung jumlah tunas total dari planlet yang hidup pada saat sub kultur kedua. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan analisis ragam Uji F menggunakan SAS 9.3. Jika terdapat beda nyata maka dilanjutkan dengan uji DMRT dan T-Dunnet pada taraf α 5%. Data *Lethal Dose 50 (LD₅₀)* dianalisis menggunakan software CurveExpert 1.3.

Analisis stomata dilakukan secara destruktif pada daun teratas yang sudah membuka sempurna dari 3 planlet per perlakuan. Bagian abaxial daun dikerik menggunakan silet, ditetesi air kemudian preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Sebanyak 5 stomata diamati untuk dihitung panjang, lebar dan jumlah kloroplas pada sel penjaga. Kerapatan stomata diperoleh dengan menghitung jumlah stomata per bidang pandang (0.196 mm²). Kerapatan stomata diambil dari 3 bidang pandang yang berbeda pada satu preparat. Data kerapatan stomata, panjang stomata, lebar stomata dan jumlah kloroplas pada sel penjaga, dihitung rerata dan standar deviasi nya menggunakan Microsoft Office Excel 2010. Data rerata yang diperoleh digunakan untuk analisis gerombol menggunakan software STAR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lethal Dose 50 (LD₅₀)

Pengaruh perendaman kolkisin terhadap Dosis lethal (*Lethal Dose*) kolkisin pada PLBs *Dendrobium sylvanum* var. *flava* diamati dengan menumbuhkan pada media M1: V&W + 1 mg L⁻¹ BAP dan media M2: V&W + 0.5 mg L⁻¹ BAP disajikan pada Tabel 1. Pada media M1 (V&W + 1 mg L⁻¹ BAP) diperoleh LD₅₀ = 0.069% dengan durasi perendaman 58.19 jam dengan pola respon kematian linier yang berarti menunjukkan semakin tinggi konsentrasi kolkisin dan semakin lama durasi perendaman maka persentase PLBs yang hidup semakin rendah. Hasil ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Sarathum *et al.* (2010) pada PLBs *Dendrobium scabrilingue* L.

Pada media 2 (V&W + 0.5 mg L⁻¹ BAP), diperoleh LD₅₀ = 0.054% dan durasi perendaman 47.63 jam. Hasil ini sejalan dengan hasil Kerduswan dan Te-chato (2012) dengan perlakuan kolkisin menghasilkan respon kematian kuadratik pada anggrek *Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum*. Berdasarkan Tabel 1. nampak ada perbedaan pengaruh konsentrasi BAP terhadap LD₅₀ pada media proliferasi yang berbeda, dengan penambahan 1 mg L⁻¹ BAP konsentrasi kolkisin untuk mencapai LD₅₀ menunjukkan nilai lebih tinggi daripada konsentrasi pada media proliferasi dengan penambahan 0.5 mg L⁻¹ BAP. Demikian pula dengan durasi perendaman dalam kolkisin, LD₅₀ pada penambahan 1 mg L⁻¹ BAP menghasilkan durasi yang lebih lama (58.19 jam) dibandingkan dengan penambahan 0.5 mg L⁻¹ BAP.

Tabel 1. Nilai LD₅₀ kolkisin pada *Dendrobium sylvanum* var. *flava* secara *In Vitro*

Faktor	Model	Persamaan	LD ₅₀	R ²
Konsentrasi Kolkisin pada Media 1	Linear Fit	y=86.69-530.47x	0.069 %	0.90
Durasi Perendaman pada Media 1	Quadratic Fit	y=79.16-2.73x+0.04x ²	58.19 jam	0.81
Konsentrasi Kolkisin pada Media 2	Quadratic Fit	y=80.28-642.60x+5168.18x ²	0.054 %	0.83
Durasi Perendaman pada Media 2	Quadratic Fit	y=78.78-1.93x+0.03x ²	47.63 jam	0.95

Pertumbuhan PLBs *Dendrobium sylvanum* var. *Flava* MV2

Hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh yang nyata dari mutagen kolkisin terhadap semua variabel pertumbuhan PLBs (data tidak disajikan). Persentase PLBs hidup dari hasil perlakuan kolkisin berbeda nyata dengan kontrol. Durasi perendaman dan media proliferasi sangat nyata mempengaruhi persentase hidup eksplan. Interaksi yang nyata antara konsentrasi dengan durasi perendaman kolkisin diperoleh pada peubah persentase hidup. Interaksi antara konsentrasi dengan durasi perendaman dan interaksi antara ketiga perlakuan nyata mempengaruhi persentase eksplan berproliferasi. Jumlah tunas yang terbentuk hanya dipengaruhi oleh konsentrasi kolkisin. Hasil yang sama dilaporkan oleh He *et al.* (2016) yaitu persentase hidup (*survival rate*) *Dendrothema indicum* var. *aromaticum* yang diberi perlakuan kolkisin menunjukkan nilai yang lebih rendah dibanding perlakuan kontrol. Persentase hidup dari PLBs *Dendrobium sylvanum* var. *flava* yang telah mendapat perlakuan kolkisin nyata dipengaruhi oleh interaksi antara konsentrasi dengan durasi perendaman dan interaksi antara media dengan durasi perendaman (Tabel 2). Rerata persentase hidup PLBs tertinggi perlakuan durasi perendaman 72 jam pada semua level

konsentrasi kolkisin namun tidak berbeda dengan kontrol. Perlakuan durasi perendaman 1 jam juga menunjukkan rerata persentase hidup yang tidak berbeda dengan kontrol, kecuali pada konsentrasi 0.1%. Hal tersebut dapat dijelaskan karena ada pengaruh media yang digunakan, dimana BAP yang digunakan baik pada konsentrasi 1 mg L⁻¹ maupun 0.5 mg L⁻¹ menunjukkan hasil persentase hidup yang tinggi. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini sama dengan hasil penelitian Atichard (2013) yang memperlihatkan persentase hidup PLBs yang rendah pada konsentrasi 0.03% dengan durasi perendaman 3 hari tetapi kemudian pada durasi yang lama (4 dan 5 hari) persentase hidupnya kembali tinggi.

Rerata persentase proliferasi tertinggi diperoleh pada perlakuan durasi perendaman kolkisin 72 jam (Tabel 3). Media V&W dengan 1 mg L⁻¹ BAP menginduksi proliferasi yang lebih tinggi pada PLBs yang diinduksi mutasi dengan konsentrasi kolkisin 0.06% - 0.1%, sedangkan pada kolkisin 0.02% dan 0.04% proliferasi lebih tinggi pada media V&W yang ditambahkan 0.5 mg L⁻¹ BAP. Atichard (2013) melaporkan penambahan 1 mg L⁻¹ NAA dan 0.5 mg L⁻¹ BA pada media V&W menghasilkan proliferasi tunas tertinggi pada PLBs *Dendrobium chrysotoxum* yang telah dimutasi kolkisin dengan konsentrasi 0.01% dan 0.02%.

Tabel 2. Interaksi durasi perendaman dengan konsentrasi kolkisin dan BAP terhadap persentase hidup PLBs *Dendrobium sylvanum* var. *Flava* pada MV1

Perlakuan	Durasi Perendaman dalam Kolkisin (jam)			
	1	24	48	72
Konsentrasi Kolkisin (%)	Persentase Hidup PLBs (%).....			
Kontrol	90.8			
0.02	86.9 a	40.4 def*	51.1 bcdef	88.5 a
0.04	73.4 abcd	46.5 cdef*	57.3 abcdef	82.7 ab
0.06	65.4 abcde	55.5 abcdef	30.5 f*	76.3 abc
0.08	74.0 abcd	23.3 f*	36.7 f*	83.4 ab
0.1	30.9 f*	47.3 cdef*	65.1 abcde	81.4 abc
KK (%) = 30.7				
BAP (mg L ⁻¹)	Persentase Hidup PLBs (%).....			
Kontrol	90.9			
1.0	59.1 bc*	42.7 cd*	33.6 d*	83.1 a
0.5	77.4 ab	45.4 cd*	56.4 c*	81.8 a
KK (%) = 30.4				

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT dengan α 5%, *= berbeda nyata terhadap kontrol berdasarkan hasil uji T-dunnet dengan α 5%.

Tabel 3. Interaksi konsentrasi, durasi perendaman kolkisin, dan media proliferasi terhadap persentase eksplan berproliferasi *Dendrobium sylvanum* var. *Flava* pada MV1

Konsentrasi Kolkisin (%)	BAP (mg L ⁻¹)	Durasi Perendaman dalam Kolkisin (jam)			
		1	24	48	72
Kontrol	42	 Eksplan Berproliferasi (%).....			
0.02	0.5	26.7 d-i	20.0 e-i	60.0 a-i	72.3 a-d
0.04	0.5	63.3 a-g	14.8 g-i	16.7 f-i	93.3 ab
0.06	0.5	70.0 a-d	33.3 d-i	36.7 g-i	43.3 b-i
0.08	0.5	77.3 a-d	08.3 i	09.3 i	69.1 a-f
0.1	0.5	66.7 a-g	33.3 d-i	28.3 d-i	67.8 a-f
0.02	1	50.0 a-i	50.0 a-i	30.0 d-i	62.5 a-h
0.04	1	46.6 a-i	49.1 a-i	53.3 a-i	53.1 a-i
0.06	1	30.0 d-i	34.4 c-i	13.3 h-i	63.3 a-h
0.08	1	16.6 f-i	26.7 d-i	33.3 d-i	96.49 a
0.1	1	22.4 e-i	30.0 d-i	16.7 f-i	86.7 abc

KK (%) = 57.45

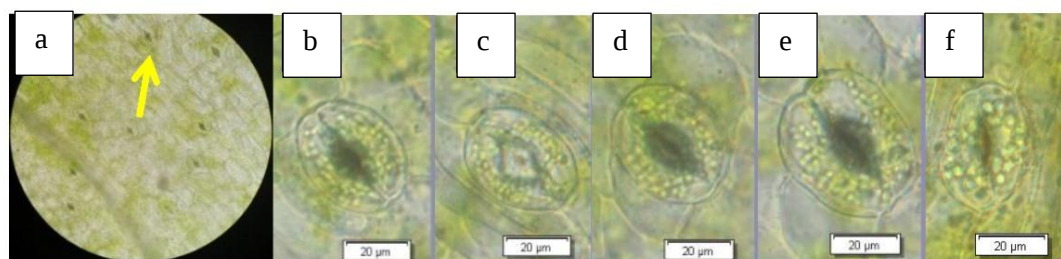
Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT dengan α 5%, *= berbeda nyata terhadap kontrol berdasarkan hasil uji T-dunnet dengan α = 5%.

Durasi perendaman berpengaruh nyata terhadap jumlah tunas. Rerata jumlah tunas tertinggi diperoleh pada PLBs yang direndam kolkisin selama 72 jam sebanyak 4.1 tunas, sementara jumlah tunas terendah ditunjukkan oleh durasi perendaman 24 jam sebanyak 2.4 tunas (data tidak disajikan).

Karakter Stomata Daun

Hasil analisis stomata daun planlet *Dendrobium sylvanum* var. *flava* pada MV2 menunjukkan fenomena kimera yang

ditunjukkan oleh adanya stomata berukuran lebih besar diantara stomata berukuran normal dan stomata dengan jumlah kloroplas pada sel penjaga lebih banyak dari normalnya (Gambar 1). Kimera yang terjadi pada induksi mutasi dapat diakibatkan oleh penyerapan mutagen yang berbeda pada tingkat individu, jaringan, maupun organ. Kimera juga dapat diakibatkan oleh jenis mutagennya. Fenomena kimera lebih banyak dijumpai pada induksi mutasi dengan kolkisin dibanding dengan oryzalin (He *et al.*, 2016).



Stomata 1	Stomata 2	Stomata 3	Stomata 4	Stomata Kontrol
k = 40	k = 44	k = 54	k = 65	k = 25
p = 36	p = 40	p = 39	p = 44	p = 35
l = 31	l = 29	l = 34	l = 39	l = 24

Keterangan: K5T2M2.2 = Konsentrasi kolkisin 0.1%, durasi perendaman kolkisin 24 jam, media proliferasi 0.5 mg L⁻¹ BAP, galur 2. Jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata (k), panjang stomata (p), lebar stomata (l), tanda panah menunjukkan stomata nomer 4. a) satu bidang pandang sediaan permukaan bawah daun galur K5T2M2.2, b-e) stomata (µm) pada galur K5T2M2.2, dan f) stomata (µm) kontrol.

Gambar 1. Kimera stomata daun planlet *Dendrobium sylvanum* var. *flava* MV2 pada perlakuan K5T2M2.2 (Konsentrasi kolkisin 0.1%, durasi perendaman kolkisin 24 jam, media proliferasi 0.5 mg L⁻¹ BAP, galur 2).



Gambar 2. Dendrogram analisis gerombol genotipe planlet *Dendrobium sylvanum* var. *flava* MV2 berdasarkan karakteristik panjang, lebar, dan kerapatan stomata serta jumlah kloroplas pada sel penjaga.

Pada Gambar 1 tersebut, terlihat bahwa dari 4 sampel stomata dari satu daun menunjukkan stomata “e” memiliki ukuran stomata lebih besar dan jumlah kloroplas lebih banyak. Munculnya kimera ini menunjukkan bahwa pada generasi MV2 ini mutasi yang terjadi belum bersifat solid. Artinya untuk mengetahui apakah mutasi yang dihasilkan sudah benar-benar solid atau justru hilang karena peristiwa *diplotic selection*, maka perlu dilakukan beberapa kali subkultur, sehingga mutan solid baru dapat dikonfirmasi pada generasi lanjut (MV3 dan seterusnya).

Analisis Gerombol Galur *Dendrobium sylvanum* var. *flava* MV2

Hasil analisis gerombol berdasarkan *Agglomerative Cluster Analysis* dengan jarak Euclidean dan metode penggerombolan ward pada mutan MV2 *Dendrobium sylvanum* var. *flava* membentuk empat gerombol (Gambar 2).

Dari hasil penggerombolan tersebut nampak gerombol 4 memperlihatkan karakteristik panjang dan lebar stomata yang bernilai tinggi, kerapatan rendah, dan jumlah kloroplas pada sel penjaga stomatanya lebih banyak dibanding kontrol (Tabel 4). Pada umumnya individu poliploid memiliki ukuran stomata lebih besar, kerapatan stomata rendah, serta jumlah kloroplas pada sel penjaga nya lebih banyak, dibandingkan dengan diploidnya (Miguel dan Leonhardt, 2011; Tharawood *et al.*, 2012; Tiwari dan Mishra, 2012; Yulianti *et al.*, 2015; Tuwo dan Indrianto, 2016; He *et al.*, 2016). Berdasarkan karakter stomata dan kloroplas pada sel penjaga stomata pada gerombol 4 tersebut diduga gerombol 4 berisi individu poliploid. Genotipe generasi MV2

yang masuk dalam gerombol 4 ini ada 13 individu MV2, yaitu K1T2M2.3, K1T4M1.1, K1T4M2.2, K1T4M2.3, K2T2M2.2, K2T3M2.1, K2T3M2.2, K3T3M1.1 K3T3M1.2, K4T3M2.2, K5T2M2.1, K5T3M2.1, dan K5T4M1.2. Sarathum *et al.* (2010) melaporkan konsentrasi yang tinggi dan durasi yang lama menghasilkan persentase poliploid tertinggi pada *Dendrobium scabrilingue* L.

Pada penelitian ini, salah satu mutan putatif diduga poliploid diperoleh juga dengan perlakuan konsentrasi kolkisin tinggi dalam durasi perendaman lama yaitu galur K5T4M2.2 (konsentrasi kolkisin 0.1%, durasi perendaman kolkisin selama 72 jam, pada media proliferasi 0.5 mg L⁻¹ BAP). Dari 13 genotipe yang masuk pada gerombol 4, nampak pada semua perlakuan konsentrasi dan durasi perendaman serta media kultur, ditemukan genotipe diduga mutan poliploid. Namun, keberadaan kimera menunjukkan pada MV2 belum dapat dipastikan galur-galur poliploid yang solid sehingga masih perlu dilakukan subkultur kembali untuk mendapatkan mutan solid. Chang *et al.* (2014) melaporkan peningkatan persentase sel mutan poliploid sebesar 75.8%-96.6% dengan subkultur mutan kimera sebanyak 4-6 generasi pada grapevine.

Pemanfaatan metode deteksi ploidi dengan menghitung jumlah kloroplas pada sel penjaga terbukti bermanfaat pada seleksi putatif poliploid pada fase pertumbuhan awal pada pertanaman dalam jumlah banyak. Disamping itu, teknik deteksinya lebih mudah dibandingkan dengan menghitung jumlah kromosom. Namun demikian, uji sitologi perlu dilakukan untuk memastikan ploidi dari setiap putatif yang dihasilkan.

Tabel 4. Rerata karakter panjang stomata, lebar stomata, kerapatan stomata, serta jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata pada MV2

Gerombol	Jumlah Galur	Panjang (µm)	Lebar (µm)	Jumlah Kloroplas	Kerapatan
Kontrol	6	31.74 ± 2.07	29.72 ± 3.58	24.72 ± 5.14	64.25 ± 5.45
1	51	30.93 ± 2.04	28.00 ± 2.44	26.13 ± 3.57	71.32 ± 10.48
2	37	30.54 ± 2.57	29.45 ± 2.14	24.99 ± 5.46	51.63 ± 8.89
3	18	33.81 ± 1.58	29.02 ± 1.64	34.67 ± 6.76	77.17 ± 7.29
4	13	37.64 ± 1.91	34.39 ± 1.97	44.52 ± 6.40	46.80 ± 8.09

Keterangan: nilai rerata karakternya merupakan nilai rerata karakter dari sejumlah galur yang diperoleh pada analisis gerombol *Dendrobium sylvanum* var. *flava* berdasarkan *Agglomerative Cluster Analysis* dengan jarak euclidean dan metode penggerombolan ward.

KESIMPULAN

LD₅₀ *Dendrobium sylvanum* var. *flava* yang dimutasi dengan kolkisin pada media proliferasi 1 mg L⁻¹ BAP diperoleh pada konsentrasi kolkisin 0.069% dan durasi perendaman 58.19 jam. Pada media proliferasi 0.5 mg L⁻¹ BAP, LD₅₀ diperoleh pada konsentrasi 0.054% dan durasi perendaman 47.63 jam. Perlakuan konsentrasi dan durasi perendaman kolkisin, serta media proliferasi berpengaruh nyata terhadap keragaman persentase hidup. Persentase proliferasi pada 6 bulan setelah subkultur dan jumlah tunas setelah 12 bulan subkultur tidak berbeda nyata dengan kontrol. Media proliferasi 1 mg L⁻¹ BAP menunjukkan rerata persentase proliferasi tertinggi (96.5%) pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0.08% dengan durasi perendaman 72 jam. Media proliferasi 0.5 mg L⁻¹ BAP, persentase proliferasi tertinggi (93.3%) pada konsentrasi kolkisin 0.04% dengan durasi perendaman 72 jam. Persentase mutan poliploid pada MV2 *Dendrobium sylvanum* var. *flava* ini belum dapat ditentukan karena stomata daunnya masih berupa kimera berdasarkan karakter jumlah kloroplas sel penjaga stomata daun dan ukuran stomata daun.

DAFTAR PUSTAKA

- Atichart, P. 2013. Polyploid induction by colchicine treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. Thai. J. Agric.Sci. 46(1): 59-63.
- Azmi, T.K.K., N.M.A. Wiendi. 2013. Perbanyakan anggrek spesies *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith melalui proliferasi tunas adventif secara *in vitro*. J. Hort. Indonesia. 4(3): 131-139.
- Azmi, T.K.K., D. Sukma, S.A. Aziz, M. Syukur. 2016. Morfologi dan pertumbuhan planlet hasil induksi poliploid melalui perlakuan kolkisin pada kuncup bunga anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L) Blume). J. Agron. Indonesia. 44(1): 68-75.
- Bautista, N.R. 2005. Polyploidy Breeding in Orchids. Philippine Orchid Review. http://www.philorchidsociety.org/index.php?option=com_content&task=view&id=43&Itemid=38. [28 Agustus 2017].
- Chang, Y.Y, X. Ji, J.L. Zhu, Y. Hao. 2014. Polyploidy induction of mutation by using colchicine on tube seedlings of Victoria Grape. Acta Hort. 1046: 265-270.
- Geier, T. 2012. Chimeras: properties and dissociation in vegetatively propagated plants. Di dalam QY Shu, BP Forster, H Nakagawa, editor. Plant Mutation Breeding and Biotechnology. London (GB). Guternberg Press Ltd. 191-201.
- Griesbach R.J. 1985. Polyploidi in Phalaenopsis orchids improvement. J. of Heredity. 76: 74-75. http://images2.wikia.nocookie.net/orchids/en/images/2/28/Polyploidy_in_Phalaenopsis_Orchid_Improvement.pdf. [10 Agustus 2017].
- Hartati, S., L. Darsana, O. Cahyono. 2014. Studi karakterisasi anggrek secara sitologi dalam rangka pelestarian plasma nutfah. Caraka Tani. J. Ilmu-Ilmu Pertanian. 29(1): 25-30.
- He, M., W. Gao, Y. Gao, Z. Liu, X. Yang, H. Jiao, Y. Zhou. 2016. Polyploidy induced by colchicine in *Dendrathera indicum* var. *aromaticum*, a scented *Chrysanthemum*. Eur. J. Hort. Sci. 81(4): 219-226.
- Kerdsuwan, N., S. Te-chato. 2012. Effects of colchicine on survival rate, morphological, physiological and cytological characters of Chang Daeng orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) *in vitro*. J. of Agric. Tech. 8(4): 1451-1460.
- Li, H., S. Zheng, I. Chunlin. 2005. Induction of polyploidy in *Dendrobium devonianum*. Yunnan Zhiwu Yanjiu. 27:552-556.
- Miguel, T.P., K.W. Leonhardt. 2011. *In vitro* polyploidy induction of orchids using oryzalin. Sci. Hort. 130: 314-319.

- Pfahl, J. 2017. *Dendrobium sylvanum*. <http://www.orchidspecies.com/densylvanum.htm>. [13 Juli 2017].
- Rahayu, E.M.D., D. Sukma, M. Syukur, Irawati. 2015. Induksi poliploidi *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume dan *Phalaenopsis amboinensis* J.J. Smith dengan colchicine dalam kultur *in vitro*. J. Agron. Indonesia. 43(3): 219-226.
- Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantiviwat, M. Nanakorn. 2010. Effect on concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Europ. J. Hort. Sci. 75(3): 123-127.
- Silva, P.A.K.X.M., C.J. Sidia, H.B.Z. Maria. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciencia Rural. 30(1): 105-111.
- Sinski, I., D.A. Bosco, N.I. Pierozzi, J.D.G. Maia, P.S. Ritschel, V. Quencini. 2013. Improving *in vitro* induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars. Euphytica. doi: 10.1007/s10681-013-1034-8.
- Sulistianingsih, R., Z.A. Suyanto, E.N. Anggia. 2004. Peningkatan kualitas anggrek *Dendrobium* hibrida dengan pemberian kolkisin. Ilmu Pertanian. 11(1): 13-21.
- Tharawood, T., W. Samyam, S. Vessabutr. 2012. Colchicine induced polyploidy of *in vitro* *Impatiens patula* Craib. Thai. J. of Bot. 4: 75-80.
- Tiwari, A.K., S.K. Mishra. 2012. Effect of colchicine on mitotic polyploidization and morphological characteristics of *Phlox drummondii*. African. J. Biotechnology. 11(39): 9336-9342.
- Tuwo, M., A. Indrianto. 2016. Improvement of orchid *Vanda* hybrid (*Vanda limbata* Blume x *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*) by colchicines treatment *in vitro*. Modern. Applied. Science. 10(11): 83-89.
- Yulianti, F., A. Purwito, A. Husni, D. Dinarti. 2015. Induksi tetraploid tunas pucuk jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour) menggunakan colchicine secara *in vitro*. J. Agron. Indonesia. 43(1): 66-71.