

Induksi Poliploid Tanaman Kangkung (*Ipomoea aquatica* Forssk.) Kultivar Salina In Vitro dengan Oryzalin
(In Vitro Polyploidy Induction of Water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.) Cultivar 'Salina' by Oryzalin)

Putri Rahmi¹, Witjaksono², & Diah Ratnadewi^{3*}

¹Program Studi Biologi Tumbuhan, Sekolah Pascasarjana. IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680.

²Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Jl. Raya Bogor Km.46, Cibinong, Kab. Bogor 16911.,

³Department Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680.

*E-mail: diahbiologi.ipb@gmail.com; dratnadewi@ipb.ac.id

Memasukkan: April 2018, **Diterima:** Agustus 2018

ABSTRACT

Water spinach is a vegetable plant consumed by people all over the world. Its small morphology requires improvement to increase the size and productivity. An alternative way to do that is by increasing the ploidy of its chromosome. This paper describes in vitro induction of polyploidy of water spinach. Inoculum of in vitro seedling, in vitro shoots and nodal stem segments were immersed in MS solution containing oryzalin at concentrations of 0.00, 1.25, 2.50, 3.75 and 5.00 μM with immersion duration of 4, 8 and 24 hours. Oryzalin treatments reduced the growth variables of the in vitro shoots of all inocula tested, compared to control of no oryzalin treatment. On immersion of 24 hours and high concentration of 5.00 μM , many inoculum failed to grow to the third passage of subculture. The best growth of in vitro shoot to the third passages occurred in the treatment combination of oryzalin 1.25 μM -8 h immersion and 2.50 μM -4 h immersion for seedling inoculum, treatment combination of 3.75 μM -4 h immersion for shoot tip inoculum and 1.25 μM -4 h immersion for nodal stem segment, compared to other treatments. Analysis of flow cytometry on 41 leaf samples from oryzalin treatment derived shoots showed 14.63% tetraploid, 36.59% mixoploid and 48.78% diploid. The efficiency of tetraploid formation reached 60%, provided only by the treatment of oryzalin 1.25 μM -8 h on seedling segments inoculum. Tetraploid shoots need to be proliferated, acclimatized, grown into planting materials and planted for agronomical analysis to provide evidence whether or not tetraploid water spinach is viable for commercial cultivation.

Keywords: water spinach (*Ipomoea aquatica*), stomate size, flow cytometry, polyploidy, tetraploids, diploids

ABSTRAK

Kangkung adalah tanaman sayuran yang digemari masyarakat di seluruh dunia. Morfologi kangkung yang kecil memerlukan perbaikan sehingga menjadi lebih besar dan meningkat produktifitasnya. Alternatifnya antara lain dengan peningkatan ploidi dari kromosomnya. Penelitian ini menjelaskan teknik induksi tetraploida pada kangkung secara in vitro. Inokulum kecambah in vitro, pucuk tunas in vitro dan buku tunas in vitro direndam dalam larutan MS yang diberi senyawa oryzalin pada taraf 0,00, 1,25, 2,50, 3,75 dan 5 μM dengan waktu perendaman 4, 8 dan 24 jam. Perlakuan oryzalin menurunkan variable pertumbuhan dari semua inokulum yang diuji dibanding perlakuan control tanpa oryzalin. Pada waktu perendaman 24 jam dan konsentrasi tinggi yakni 5 μM , banyak tunas yang tidak tumbuh sampai subkultur ke-3. Pertumbuhan tunas in vitro terbaik sampai subkultur ke-3 diperoleh pada kombinasi perlakuan oryzalin 1,5 μM -8 jam dan 2,50 μM -4 jam dari inokulum kecambah, perlakuan 3,75 μM -4 jam dari inokulum pucuk tunas dan perlakuan 1,25 μM -4 jam dari inokulum buku tunas dibandingkan dengan perlakuan oryzalin lainnya. Uji flow cytometry dilakukan pada 41 sampel daun dari tunas hasil perlakuan oryzalin menunjukkan 14,3% tetraploid, 36,59% miksoploid dan 48,78% diploid. Efisiensi induksi tetraploid mencapai 60%, hanya diperoleh pada kombinasi perlakuan oryzalin 1,25 μM -8 jam dari inokulum kecambah. Tunas tetraploid perlu diperbanyak, diaklimatisasi dibibitkan dan diuji agronomi untuk pembuktian produktifitas kangkung tetraploid dalam budidaya sayuran.

Kata Kunci : kangkung (*Ipomoea aquatica*), ukuran stomata, flow cytometry, poliploidi, tetraploid, diploid.

PENDAHULUAN

Kangkung adalah salah satu jenis tanaman yang berasal dari suku Convolvulaceae, genus *Ipomoea*, dan memiliki sinonim *Ipomoea reptans*

Poiret. Kangkung termasuk salah satu tanaman dataran rendah dan merupakan salah satu jenis tanaman herba tahunan yang dikonsumsi sebagai sayuran dan digemari oleh masyarakat di seluruh dunia.

Tanaman kangkung adalah diploid ($2n=2x=30$) (Sinha & Sharma 1992) dengan morfologi batang dan daun yang berukuran kecil. Salah satu upaya peningkatan produktivitas dan biomassa dapat dilakukan dengan peningkatan ploidi. Tanaman poliploid dapat dihasilkan secara buatan, salah satunya, dengan perlakuan agen kimia sebagai senyawa antimitosis. Allum *et al.* (2007), Wang *et al.* (2015) dan Widoretno (2016), menunjukkan bahwa tanaman poliploid seperti tetraploid yang diinduksi memiliki kelebihan berupa morfologi tanaman yang lebih besar ukurannya dibandingkan dengan tanaman normal yang diploid ($2n$). Liu *et al.* (2011) menemukan keunggulan lainnya dari tanaman tetraploid yaitu memiliki ketahanan terhadap cekaman lingkungan tertentu. Jati tetraploid hasil induksi *in vitro* lebih tahan kering dibanding yang diploid (Ridwan *et al.* 2018).

Tanaman poliploid dapat dihasilkan melalui induksi dengan senyawa kimia yang menghambat pembentukan gelendong dalam mitosis seperti kolkisin, oryzalin (Thao *et al.* 2003) atau trifluralin (Cheng *et al.* 2012) pada biak tunas dalam kultur jaringan. Tanaman tetraploid telah berhasil diinduksi pada pisang Mas Lumut, *Musa acuminata*, AA (Poerba *et al.* 2014), Pisang Rejang mixoploid (kimera diploid dan tetraploid), *Musa acuminata* Colla, AA (Poerba *et al.* 2016), dan tidak kurang dari 10 klon lain (Poerba *et al.* 2018), semangka, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Naskai (Jaskani *et al.* 2007), *dragonhead*, *Dracocephalum moldavica* L. (Omidbaigi *et al.* 2010), jambu biji merah, *Psidium guajava* L. (Handayani *et al.* 2017), kacang biduk, *Lablab purpureus* (L) Schott. Sweet (Dheer *et al.* 2014), jahe, *Zingiber officinale* Roscoe (Adaniya & Shirai 2001), talas, *Colocasia esculenta* L. (Wulansari *et al.* 2016), krisan (*Dendranthema nankingense* Hand-Mazz) Tzvel. (Liu *et al.* 2011) dan *mulberry*, *Morus multicaulis* Pem. (Xi-Ling *et al.* 2011).

Tulisan ini melaporkan hasil penelitian tentang induksi tetraploidi pada kangkung secara *in vitro* dengan tujuan menghasilkan kultivar dengan ukuran tanaman dan produktifitas yang lebih tinggi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Benih kangkung (*Ipomoea aquatica*) kultivar “Salina” dari EAST-WEST SEED INDONESIA

direndam di dalam larutan alkohol 70% selama 3 menit kemudian dicuci dengan aquades steril sebanyak 3 kali, lalu direndam dalam larutan “Bayclin” 20% dan 10% (dengan bahan aktif NaOCl 5.25%, dan masing-masing ditetesi 4 tetes Tween 80 per 100 ml larutan) berturut-turut selama 10 menit dan 20 menit, kemudian dicuci dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Benih kangkung kemudian dikultur pada media perkecambahan MSO dengan formulasi media dasar MS ditambah sukrosa 30 g/L, dan MSP dengan formulasi seperti MSO tetapi dengan tambahan 0,1 mg/L BA dan 0,1 mg/L NAA. Keasaman media (pH) diatur pada nilai 5,8, dan media dipadatkan dengan Gelrite 2 g/L. Media dimasukkan dalam botol biak sebanyak masing-masing 25 ml dan disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media disimpan selama minimal sehari sebelum dipakai. Setiap botol media kultur diisi 5 biji kangkung dengan 10 kali ulangan dan diinkubasi pada suhu 25°C dengan intensitas cahaya sekitar 70 μmol foton/ m^2/s secara terus menerus selama 1 minggu.

Inokulum yang digunakan untuk perlakuan oryzalin terdiri dari 3 jenis, yaitu pucuk tunas kangkung, buku batang, dan kecambah. Kecambah usia 3 hari diperoleh dari biji yang ditanam secara *in vitro*, sedangkan pucuk dan buku dipotong dari tanaman *in vitro* hasil perbanyakan sebelumnya. Semua inokulum direndam di dalam media MSP cair dengan perlakuan konsentrasi oryzalin yaitu 0,00, 1,25, 2,50, 3,75 dan 5,00 μM dengan waktu perendaman 4, 8, dan 24 jam. Inokulum yang direndam dalam oryzalin ditaruh pada meja pengocok (*shaker*) dengan kecepatan 125 rpm. Terdapat 15 perlakuan dengan 4 kali ulangan. Setelah perlakuan perendaman, inokulum dibilas dalam media dasar MS cair, lalu dikultur pada media MSO padat selama 14 hari dan disubkultur setiap 2 minggu sekali hingga subkultur ke-3. Pengamatan dilakukan setelah subkultur ke-3, pada 14 hari setelah subkultur.

Tingkat ploidi tanaman diidentifikasi menggunakan alat *flow cytometry* menurut Handayani *et al.* (2017). Daun segar dari tunas yang tumbuh *in vitro* dari perlakuan kombinasi antara oryzalin dengan waktu perendaman diambil secara acak sebanyak 41 sampel. Daun segar seukuran 1 cm^2 ditetesi 250 μL larutan penyangga sistein UV-ploidi (Partec, Germany), selanjutnya dicacah

dengan silet sampai hancur untuk mengekstrak inti sel. Hasil cacahan daun disaring dengan saringan *millipore* 30 μm . Filtrat dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambahkan 1 mL larutan penyangga pewarnaan (propidium iodida 6 μL dan 3 μL *RNAse stok solution* dengan perbandingan 2:1) untuk mewarnai kromosom dari inti sel yang sudah terpisah. Kemudian kuvet dimasukkan ke dalam alat *BD Accuri™ C6 Plus flow cytometry* (USA) untuk analisis ploidinya. Sampel kontrol dari tanaman diploid dikalibrasi pada puncak 50.000, dan karena itu puncak 100.000 menunjukkan tanaman tetraploid dan keberadaan kedua puncak tersebut menunjukkan adanya tanaman miksploid.

Pengamatan morfologi stomata dilakukan mengikuti metode Tulay & Unal (2010) yang telah dimodifikasi terhadap tunas yang telah diidentifikasi ploidinya sebagai upaya konfirmasi metoda identifikasi ploidi. Lapisan epidermis di bagian bawah dan atas daun kangkung diolesi kuteks bening dan dibiarkan hingga kering, kemudian ditempel selotip. Selotip kemudian dikelupas dan bersama lapisan kuteks yang terikut ditempelkan pada gelas preparat untuk pengamatan. Preparat diletakkan di atas kaca benda dan diamati di bawah mikroskop Olympus CX23 pada pembesaran 400x dengan

menggunakan software Optilab. Panjang dan lebar stomata, serta kerapatan stomata tanaman diploid, tetraploid dan miksploid diukur menggunakan mikrometer dengan 4 kali ulangan. Setiap ulangan, untuk ukuran stomata, terdiri dari 3 bidang pandang dan setiap bidang pandang diukur 3 stomata. Kerapatan stomata dihitung dengan membagi jumlah stomata yang terhitung dengan mm^2 luas bidang pandangnya.

Data hasil pengamatan terhadap pertumbuhan vegetatif planlet hasil induksi poliploid dan karakteristik stomata dirata-rata dan dihitung galat bakunya untuk menentukan beda nyata.

HASIL

Perkecambahan dan pertumbuhan kangkung secara *in vitro*

Biji kangkung mampu berkecambah 100% pada 7 hari setelah tanam pada kedua media perkecambahan *in vitro* yang diuji. Pertumbuhan tanaman kangkung pada media MSO lebih cepat, jumlah akarnya lebih banyak dan lebih panjang, tetapi lebih kecil ukurannya dibandingkan pada media MSP. Meskipun demikian, pertumbuhan tanaman kangkung pada media MSP menghasilkan

Tabel 1. Efek pemberian kombinasi oryzalin dan waktu perendaman terhadap jumlah tunas dari berbagai inokulum kangkung *I. aquatica* cv. *salina in vitro* setelah subkultur ke-3 pada 14 hari setelah subkultur.

Inokulum awal	Perlakuan oryzalin (μM)	Lama perendaman (jam)			
		4	8	24	
Kecambah	0	0,25 \pm 0,29	0,58 \pm 0,19	0,67 \pm 0,23	
	1.25	0,47 \pm 0,33	0,82 \pm 0,15	0,05 \pm 0,10	
	2.5	0,76 \pm 0,22	0,23 \pm 0,26	0,39 \pm 0,45	
	3.75	0,40 \pm 0,27	0,00 \pm 0,00	0,23 \pm 0,46	
	5	0,06 \pm 0,13	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
	Pucuk	0	0,62 \pm 0,43	0,75 \pm 0,16	0,84 \pm 0,15
Pucuk	1.25	0,15 \pm 0,30	0,16 \pm 0,33	0,00 \pm 0,00	
	2.5	0,35 \pm 0,39	0,22 \pm 0,44	0,00 \pm 0,00	
	3.75	0,74 \pm 0,85	0,20 \pm 0,40	0,00 \pm 0,00	
	5	0,24 \pm 0,48	0,17 \pm 0,35	0,11 \pm 0,21	
	Buku tunas	0	0,62 \pm 0,43	0,45 \pm 0,52	0,80 \pm 0,15
		1.25	0,87 \pm 1,01	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
2.5		0,19 \pm 0,37	0,44 \pm 0,52	0,00 \pm 0,00	
3.75		0,06 \pm 0,13	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
5		0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	

warna tunas, daun dan batang yang lebih hijau serta batang yang lebih tebal dibandingkan dengan tanaman pada media MSO (data tidak diterbitkan)

Pengaruh perlakuan oryzalin pada rata-rata jumlah tunas biak tunas kangkung *in vitro*

Perlakuan konsentrasi oryzalin dan lama perendaman berpengaruh nyata pada rata-rata jumlah tunas biak tunas kangkung (Tabel 1). Secara umum, masing-masing perlakuan peningkatan konsentrasi oryzalin dan perlakuan lama perendaman menurunkan rata-rata jumlah tunas yang terbentuk. Kedua perlakuan tersebut cenderung berinteraksi karena pada lama perendaman yang lebih panjang (8 dan 24 jam dibanding 4 jam), konsentrasi yang lebih tinggi (3,75 dan 5,00 μM) mengakibatkan kematian tunas.

Perbedaan inokulum menunjukkan sensitifitas yang berbeda terhadap perlakuan konsentrasi maupun perlakuan lama perendaman. Misalnya pada inokulum pucuk, penurunan rata-rata jumlah tunas yang nyata hanya terjadi pada perlakuan perendaman 24 jam, yaitu tunas telah mati pada konsentrasi oryzalin yang terendah sekalipun (1,25 μM), sedangkan pada inokulum yang lain, yaitu kecambah dan buku tunas, penurunan jumlah tunas telah terjadi pada perendaman

yang lebih singkat (8 jam), walaupun dimulai pada konsentrasi yang lebih tinggi (3,75 μM).

Rataan jumlah tunas yang memadai diperoleh dari inokulum kecambah pada kombinasi perlakuan 1,25 μM -8 jam dan 2,50 μM -4 jam dengan rata-rata 0,82 tunas dan 0,76 tunas dan juga dari inokulum buku tunas pada perlakuan 1,25 μM -4 jam dengan rata-rata 0,87 tunas. Taraf oryzalin 1,25 μM perendaman 8 jam dari inokulum kecambah dan 1,25 μM -4 jam dari inokulum buku tunas masih efektif untuk menghasilkan tunas tanaman kangkung secara *in vitro*. Dengan demikian, perlakuan oryzalin sendiri memang tidak dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah tunas dibandingkan dengan perlakuan kontrol (0,00 μM) (Tabel 1).

Pengaruh kombinasi perlakuan konsentrasi oryzalin dan lama perendaman terhadap rata-rata jumlah buku tunas (Tabel 2) menunjukkan pola yang sama dengan pengaruh terhadap jumlah tunas (Tabel 1), yaitu rata-rata jumlah buku tunas menurun dengan meningkatnya konsentrasi oryzalin dan lamanya perendaman. Juga, perlakuan oryzalin sendiri pada ketiga inokulum perlakuan memperlihatkan respon berbeda-beda terhadap pertumbuhan jumlah buku. Perlakuan kombinasi 2,50 μM oryzalin-4 jam perendaman pada inokulum kecambah, perlakuan 3,75 μM -4 jam

Tabel 2. Pengaruh perlakuan kombinasi oryzalin dan waktu perendaman terhadap rata-rata jumlah buku (\pm galat baku) dari berbagai inokulum kangkung *I. aquatica* cv. *salina* setelah subkultur ke-3 pada 14 hari setelah subkultur.

Inokulum awal	Perlakuan oryzalin (μM)	Lama perendaman (jam)		
		4	8	24
Kecambah	0	0,38 \pm 0,57	1,05 \pm 0,53	1,09 \pm 0,45
	1.25	0,79 \pm 0,81	0,98 \pm 0,48	0,10 \pm 0,20
	2.5	1,17 \pm 0,22	0,64 \pm 0,94	0,43 \pm 0,57
	3.75	0,40 \pm 0,31	0,00 \pm 0,00	0,32 \pm 0,63
	5	0,19 \pm 0,38	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Pucuk	0	0,58 \pm 0,54	0,83 \pm 0,55	0,84 \pm 0,44
	1.25	0,03 \pm 0,05	0,26 \pm 0,53	0,00 \pm 0,00
	2.5	0,57 \pm 0,65	0,22 \pm 0,44	0,00 \pm 0,00
	3.75	1,28 \pm 1,49	0,05 \pm 0,10	0,00 \pm 0,00
	5	0,60 \pm 1,20	0,12 \pm 0,23	0,04 \pm 0,09
Buku tunas	0	0,51 \pm 0,34	0,53 \pm 0,61	1,04 \pm 0,70
	1.25	1,09 \pm 1,25	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	2.5	0,24 \pm 0,48	0,75 \pm 1,12	0,00 \pm 0,00
	3.75	0,06 \pm 0,13	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	5	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

pada inokulum pucuk dan perlakuan 1.25 μ M-4 jam pada inokulum buku tunas merupakan perlakuan terbaik dan menunjukkan jumlah buku tertinggi dengan nilai berturut-turut 1,17 buku, 1,28 buku dan 1,09 buku, daripada kombinasi perlakuan lainnya, kecuali perlakuan kontrol.

Pengamatan poliploid dengan *flow cytometry* dan pengamatan stomata.

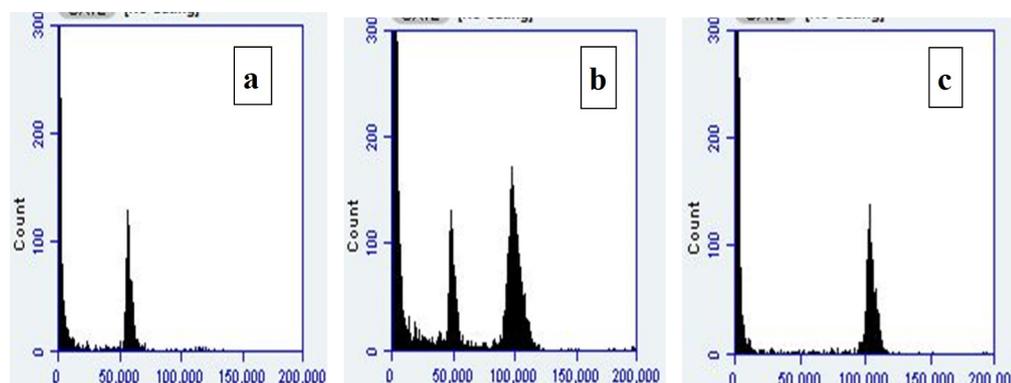
Analisis *flow cytometry* terhadap 41 sampel daun dari tunas/plantlet kangkung menunjukkan 48,78% diploid, 36,59% mikroploid dan 14,63% tetraploid (Tabel 3). Plantlet tetraploid ditunjukkan dengan puncak pada nilai 100000 yang merupakan kelipatan dua dari kontrol diploid yang ditunjukkan dengan nilai puncak 50000, sedangkan keberadaan kedua puncak tersebut menunjukkan adanya tanaman dengan ploidi

kimera antara diploid dan tetraploid dan disebut mikroploid (Gambar 1). Sampel tetraploid dan mikroploid dihasilkan pada semua konsentrasi oryzalin yang diuji, dari 1,25-5,00 μ M dengan lama perendaman optimum 8 jam, walaupun perendaman 4 atau 24 jam juga menghasilkan sampel daun poliploid. Inokulum yang paling banyak menghasilkan sampel tetraploid adalah inokulum kecambah. Sampel yang telah sepenuhnya tetraploid diperoleh dari inokulum kecambah yang direndam oryzalin selama 8 jam dalam konsentrasi 1,25 μ M.

Kerapatan stomata dari sampel diploid mempunyai keragaman jumlah yang tinggi tetapi tidak berbeda nyata dengan mikroploid dan hampir dua kali dari kerapatan stomata sampel tetraploid yang relatif seragam antar sampel. Rata-rata panjang dan lebar stomata antara diploid dan mikroploid tidak berbeda nyata,

Tabel 3. Hasil analisis ploidi pada 41 sampel tanaman *I. aquatica* cv. *salina* yang disampel secara acak setelah subkultur ke-3 pada 14 hari setelah subkultur.

Orizalin (μ M)	Perlakuan		Asal inokulum	Jumlah tanaman	Hasil			Efisiensi tetraploid (%)	induksi
	Waktu (jam)				2x	2x+4x	4x		
0,00	24		Pucuk	1	1	-	-	0	
1,25	4		Pucuk	1	1	-	-	0	
1,25	4		Buku tunas	3	3	-	-	0	
1,25	8		Kecambah	10	1	3	6	60	
1,25	8		Pucuk	4	-	4	-	0	
2,50	4		Pucuk	1	1	-	-	0	
2,50	4		Buku tunas	2	2	-	-	0	
2,50	4		Kecambah	2	-	2	-	0	
2,50	8		Buku tunas	2	1	1	-	0	
3,75	4		Pucuk	4	4	-	-	0	
3,75	8		Pucuk	1	1	-	-	0	
3,75	24		Kecambah	4	-	4	-	0	
5,00	4		Pucuk	3	3	-	-	0	
5,00	8		Pucuk	3	2	1	-	0	



Gambar 1. Histogram *flow cytometry* dari berbagai tingkat ploidi tanaman *I. aquatica* cv. “*Salina*”: a. diploid (kontrol), b. mikroploid dan c. tetraploid.

tetapi secara nyata lebih kecil dari tetraploid (Tabel 4).

PEMBAHASAN

Induksi poliploidi pada tanaman kangkung telah berhasil dilakukan pada tahap tunas *in vitro* untuk 1 varietas kangkung komersial “Salina”. Percobaan perkecambahan biji untuk induksi poliploidi telah dilakukan pada beberapa varietas komersial tetapi terkendala oleh kontaminasi yang sangat hebat (data tidak dipublikasi) dan hanya 1 varietas “Salina” yang berhasil tumbuh *in vitro* dalam jumlah yang cukup.

Induksi poliploidi pada kangkung pada percobaan ini dilakukan pada inokulum pucuk, buku tunas dan kecambah *in vitro*. Setelah perlakuan perendaman dalam oryzalin, inokulum ditumbuhkan pada medium proliferasi, namun pada umumnya inokulum hanya membentuk tunas tunggal yang memanjang dan membentuk lebih dari satu buku. Dengan demikian pemisahan sel-sel yang terinduksi menjadi tetraploid hanya terjadi melalui penambahan buku tunas, dan pertumbuhan tunas samping tunggal. Upaya proliferasi tunas majemuk dengan perlakuan BA baik tunggal maupun kombinasi dengan auksin tidak efektif untuk menginduksi proliferasi tunas samping (data tidak dipublikasi).

Perendaman inokulum dalam senyawa oryzalin dengan berbagai konsentrasi dan lama yang berbeda secara nyata berpengaruh terhadap pertumbuhan tunas dari inokulum. Peningkatan konsentrasi dan lama perendaman menurunkan pertumbuhan, sampai pada kematian inokulum pada konsentrasi tertinggi (5 μM) pada lama perendaman 8 dan 24 jam. Namun pada konsentrasi yang lebih rendah dan atau lama perendaman yang lebih pendek, inokulum tetap tumbuh dan berproliferasi dan menghasilkan tunas yang poliploid. Hal ini menunjukkan bahwa selang konsentrasi 1,25-2,50 μM dengan perendaman 4-8 jam efektif untuk induksi poliploidi kangkung “Salina” dari berbagai inokulum.

Induksi poliploidi seperti yang ditunjukkan dari hasil analisis *flow cytometer* sampel daun dari biak tunas yang telah diperlakukan telah berhasil dilakukan sampai tahap tunas *in vitro*. Ini merupakan laporan yang pertama tentang induksi poliploidi pada kangkung secara *in vitro*. Ploidi tanaman hasil induksi poliploidisasi ditentukan dengan analisis dengan *flow cytometry*. Identifikasi ploidi menggunakan *flow cytometry* memberikan hasil yang lebih akurat dan lebih cepat (Tang *et al.* 2010). Indikator penentuan ploidi pada tanaman dapat dilakukan dengan menganalisis kandungan total DNA di dalam inti sel. Kandungan total DNA pada poliploidisasi akan meningkat sejalan dengan terjadinya penggandaan kromosom (Moghbel *et al.* 2015). Penggandaan kromosom tanaman secara *in vitro* dapat ditingkatkan dengan mengganggu siklus sel. Penggandaan kromosom yang sempurna terjadi pada siklus sel antara fase S (sintesis DNA) hingga akhir fase M (mitotik) atau sebelum terjadinya sitokinesis (Dhooghe *et al.* 2011).

Dari inokulum yang dicoba pada konsentrasi oryzalin dan rezim perendaman yang dicoba, frekuensi tetraploid yang paling tinggi diperoleh pada kecambah. Inokulum yang berbeda untuk induksi poliploidi menunjukkan efektifitas yang berbeda (Xie *et al.* 2015). Konsentrasi oryzalin yang dicoba dan lama perendaman pada percobaan ini terbukti efektif, namun hasil yang terbaik diperoleh pada perendaman selama 8 jam dengan konsentrasi 1,25 μM . Pada tanaman hibrid *Vitis x Muscadinia*, efisiensi induksi tetraploid sangat dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa antimitotik, durasi waktu perendaman dan inokulum yang digunakan (Xie *et al.* 2015). Viehmannova *et al.* (2009) mendapatkan efisiensi induksi poliploid tertinggi pada tanaman *Smallanthus sonchifolius* pada perlakuan oryzalin sangat tinggi, yakni 25 μM dengan perendaman 48 jam sebesar 10% (4 tanaman).

Induksi poliploidi memerlukan subkultur untuk memisahkan kimera antara sel poliploid

Tabel 4. Ukuran stomata tanaman *I. aquatica* cv. “Salina” *in vitro* pada tingkat ploidi yang berbeda.

Tingkat Ploidi	Kerapatan stomata/mm ²	Panjang stomata (μm)	Lebar stomata (μm)
Diploid ($2n = 2x$)	58,95 \pm 30,26	23,68 \pm 0,35	14,10 \pm 2,10
Miksoploid ($2n+4n = 2x+4x$)	60,41 \pm 14,19	24,51 \pm 1,73	14,17 \pm 1,09
Tetraploid ($4n = 4x$)	32,02 \pm 9,87	32,93 \pm 0,83	19,60 \pm 2,14

dan sel-sel diploid asal. Pada percobaan ini, pada subkultur yang ketiga telah diperoleh tunas teraploid dari inokulum kecambah, walaupun banyak tunas mikroploid yang juga dihasilkan. Induksi poliploidi pada pisang mas lumut, tunas tetraploid berhasil diperoleh setelah subkultur 6 tahap (Poerba *et al.* 2014).

Konfirmasi tunas *in vitro* poliploid menurut analisis *flow cytometry* dengan pengamatan morfologi menunjukkan bahwa panjang dan lebar stomata pada tanaman tetraploid secara nyata lebih besar dari diploid maupun mikroploid. Demikian juga kerapatan stomata pada tanaman tetraploid mempunyai keseragaman yang tinggi tetapi nilainya jauh lebih rendah dibanding yang diploid. Hal ini menunjukkan bahwa identifikasi ploidi pada kangkung dapat dilakukan dengan pengukuran stomata. Ukuran stomata pada tanaman poliploid lebih besar dengan kerapatan stomatanya yang lebih rendah telah dilaporkan oleh Zhou *et al.* (2017) pada tanaman singkong. Tang *et al.* (2010) menunjukkan bahwa pengamatan stomata merupakan salah satu metode cepat dan efektif untuk pendugaan tanaman tetraploid sebelum transplantasi ke lapang.

Induksi poliploidi pada tanaman kangkung merupakan suatu upaya untuk mendukung program pemuliaan tanaman sayuran. Harapan utama dari poliploidisasi adalah untuk menghasilkan tanaman dengan karakteristik morfologi yang lebih besar (Liu *et al.* 2011). Poliploidisasi lebih digunakan untuk meningkatkan sifat agronomi dari tanaman yang memiliki nilai ekonomis tinggi (Rego *et al.* 2011). Poliploidisasi pada tanaman kangkung telah berhasil dilakukan dengan menggunakan oryzalin sampai pada tahap biak tunas. Biak tunas perlu diperbanyak untuk selanjutnya diaklimatisasi dan diuji sifat agronominya untuk membuktikan apakah kultivar kangkung tetraploid ini menunjukkan morfologi dan produktifitas yang lebih tinggi. Bila memang demikian, maka pendekatan poliploidi dapat diterapkan untuk jenis sayur-sayuran yang lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Dr. Trimuji Ermayanti dan Erwin Havillah, MSi dari Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI atas fasilitas dan bantuan teknisnya dalam analisis

flow cytometry. Penulis menyampaikan penghargaan atas bantuan teknis dari Katarina Utami Nugraheni SP, Tri Handayani MSi dan Aryani Leksonowati MSi dari Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi LIPI. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah memberikan bantuan secara finansial berupa beasiswa tesis/disertasi tahun 2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Adaniya, S. & D. Shirai. 2001. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Scientia Horticulturae*. 88:277-287.
- 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 Reports*. 26:1977-1984.
- Cheng, ZH., XJ. Zhou, MA. Khan, L. Su & HW. Meng. 2012. In vitro induction of tetraploid garlic with trifluralin. *Genetics and Molecular Research*. 11(3):2620-2628.
- Dheer, M., RA. Sharma, VP. Gupta & SS. Punia. 2014. Cytomorphological investigations in colchicine-induced polyploids of *Lablab purpureus* (L.) Sweet. *Indian Journal of Biotechnology*. 13:347-355.
- Dhooghe, E., KV. Laere, Eeckhaut, L. Leus & JV. Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 104:359-373.
- Handayani, T., Witjaksono & KU. Nugraheni. 2017. Induksi tetraploid pada tanaman jambu biji merah (*Psidium guajava* L.) secara *in vitro*. *Jurnal Biologi Indonesia*. 13(2):271-278.
- Jaskani, MJ., SW. Kwon, Z. Hussain & IA. Khan. 2007. Breeding polyploid watermelon: induction, identification and seed germination of tetraploids. *International Symposium on Prospects of Horticultural Industry in Pakistan*. Faisalabad. 28-30 Maret 2007. 274-282.
- Liu, S., S. Chen, Y. Chen, Z. Guan, D. Yin & F. Chen. 2011. In vitro induced tetraploid of

- Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. *Scientia Horticulturae*. 127:411-419.
- Moghbel, N., MK. Borujeni & F. Bernard. 2015. Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 13:1-6.
- Omidbaigi, R., S. Yavari, ME. Hassani & S. Yavari. 2010. Induction autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 18(1):23-35.
- Poerba, YS., Witjaksono, F. Ahmad & T. Handayani. 2014. Induksi dan karakterisasi pisang mas lumut tetraploid. *Jurnal Biologi Indonesia*. 10(2):191-200.
- Poerba, YS., Witjaksono & T. Handayani. 2016. Pembentukan dan Penampilan Pisang Rejang Hibrid Triploid Hasil Persilangan Pisang Rejang Mixoploid Dengan Pisang Rejang Diploid. *Jurnal Biologi Indonesia*. 12(1):19-30.
- Poerba, YS., D. Martanti, F. Ahmad, Herlina, T. Handayani & Witjaksono. 2018. Deskripsi Pisang Koleksi Pusat Penelitian Biologi LIPI. LIPI Press, Jakarta. 312 p.
- Rego, MM., ER. Rego, CH. Bruckner, FL. Finger & WC. Otoni. 2011. In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 107:451-459.
- Ridwan, T. Handayani, I. Riastiwi & Witjaksono. 2018. Bibit jati tetraploid lebih toleran terhadap cekaman kekeringan daripada bibit jati diploid asalnya. *Jurnal Penelitian Kehutanan Wallacea*. 7(1):1-11.
- Sinha, S. & SN. Sharma. 1992. Taxonomic significance of karyomorphology in *Ipomoea* spp. *Cytologia*. 57:289-293.
- Tang, ZQ., DL. Chen, ZJ. Song, YC. He & DT. Cai. 2010. In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 102:213-220.
- Thao, NTP., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki & H. Okuba. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72:19-25.
- Tulay, E. & M. Unal. 2010. Production of colchicine induced tetraploids in *Vicia villosa* Roth. *Caryologia*. 63(3):292-303.
- Viehmanna, I., EF. Cusimamani, M. Bechyne, M. Vyvadilova & M. Greplova. 2009. In vitro induction of polyploidy in yacon (*Smilax sonchifolius*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 97:21-25.
- Wang, X., H. Wang, C. Shi, X. Zhang, K. Duan & J. Luo. 2015. Morphological, cytological and fertility consequences of a spontaneous tetraploid of the diploid pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) cultivar 'Cuiguan'. *Scientia Horticulturae*. 189:59-65.
- Widoretno, W. 2016. In vitro induction and characterization of tetraploid patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 125:261-267.
- Wulansari, A., AF. Martin & TM. Ermayanti. 2016. Induksi tanaman poliploid talas (*Colocasia esculenta* L.) dengan perlakuan oryzalin secara in vitro. *Jurnal Biologi Indonesia*. 12(2): 297-305.
- Xie, X., CB. Aguero, Y. Wang & MA. Walker. 2015. In vitro induction of tetraploids in *Vitis x Muscadinia* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 122:675-683.
- Xi-Ling, W., Z. Jin-Xing, Y. Mao-De, L. Zhen-Gang, J. Xiao-Yun & L. Qi-You. 2011. Highly efficient plant regeneration and in vitro polyploidy induction using hypocotyl explants from diploid mulberry (*Morus multicaulis* Poir.). *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*. 47:434-440.
- Zhou, HW., WD. Zeng & HB. Yan. 2017. In vitro induction of tetraploids in cassava variety 'Xinxuan 048' using colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 128:723-729.