

## Induksi mutasi *Stevia rebaudiana* dengan perendaman kolkisin secara *in vitro*

*Induced mutation of Stevia rebaudiana through colchicine soaking in vitro*

Masna Maya SINTA<sup>1)2)\*</sup>, Ni Made Armini WIENDI<sup>1)</sup> & Syarifah Iis AISYAH<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Fakultas Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor 16680

<sup>2)</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16128, Indonesia

Diterima tgl 10 Oktober 2017 / disetujui tgl 22 Desember 2017

### Abstract

*Stevia rebaudiana Bert. is a plant producing steviol glycosides that have 200-300 times sweeter than sucrose. These steviol glycosides are produced in the leaves and then spread to all parts of the plant including stems. The use of superior stevia planting material is important for stevia sugar industry. One of the stevia breeding programme is to increase genetic diversity through colchicine soaking to produce polyploid plants. Polyploid plants usually have higher vigor than diploid plants. The purpose of this research was to induce genetic diversity of stevia through colchicine soaking in vitro. Single nodes of sterile stevia clone BS were soaked in colchicine at the concentration of 0.01; 0.02; 0.04; 0.08 and 0.1% for 48 and 72 hours, and in sterile aquadest as a control. Plantlet subcultures were done until MV4 (mutant vegetative 4). Putative mutants were observed by plantlet vigor and stomata analyses on MV5. Vigor of plantlets was observed by counting the number of leaves, nodes, roots, fresh weight and dry weight of the plantlet. Stomata analysis was performed by calculating stomata density, stomata size and chloroplast number in stomata guard cells. Results showed that colchicine soaking treatment increased significantly fresh weight and dry weight of putative mutants. Colchicine soaking treatment increased chloroplast number on stomata guard cell and stomata size, but decreased stomata density. Stevia soaked in colchicine for 48 hours at concentration 0.01-0.04% produce putative mutants with high chromosome numbers.*

[Key words: poliploidy, stomata, chloroplast, mutant]

### Abstrak

*Stevia rebaudiana Bert.* merupakan tanaman penghasil glikosida steviol yang memiliki tingkat kemanisan 200-300 kali lebih tinggi dibandingkan sukrosa. Glikosida steviol ini diproduksi di daun yang kemudian disalurkan ke bagian tanaman lainnya termasuk batang. Penggunaan klon terbaik stevia merupakan salah satu kunci penting keberhasilan industri gula stevia. Salah satu program pemuliaan tanaman stevia adalah

meningkatkan keragaman tanaman melalui mutasi dengan kolkisin sehingga menghasilkan tanaman poliploid. Tanaman poliploid umumnya memiliki vigor lebih baik dibandingkan tanaman diploid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan keragaman stevia melalui perendaman kolkisin *in vitro*. Buku tunggal steril stevia klon BS direndam dalam kolkisin dengan konsentrasi 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 dan 0,1% selama 48 dan 72 jam dengan perendaman dalam air steril sebagai kontrol. Sub kultur dilakukan hingga MV4 (mutan vegetatif 4). Pengamatan mutan putatif dilakukan meliputi analisis morfologi dan stomata pada MV5. Analisis morfologi dilakukan dengan mengamati jumlah daun, buku, akar, bobot basah serta bobot kering planlet. Analisis stomata dilakukan dengan menghitung kerapatan stomata, ukuran stomata serta jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata. Hasil menunjukkan bahwa perendaman stevia pada kolkisin meningkatkan bobot basah serta bobot kering stevia *in vitro*. Perlakuan perendaman kolkisin meningkatkan jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata serta ukuran stomata namun menurunkan kerapatan stomata. Perendaman stevia selama 48 jam pada konsentrasi kolkisin 0,01-0,04% menghasilkan mutan putatif dengan jumlah kromosom tertinggi.

[Kata kunci: poliploidi, stomata, kloroplas, mutan]

### Pendahuluan

*Stevia rebaudiana Bert.* ( $2n=2x=22$ ) telah lama dikenal sebagai tanaman pemanis alami (Kinghorn, 2002). Tanaman yang berasal dari Paraguay ini mampu menghasilkan glikosida steviol yang memiliki rasa manis 200-300 kali lebih tinggi dibandingkan gula sukrosa. Rendemen glikosida steviol pada daun stevia berkisar 4-20% dari daun kering, bergantung pada kultivar stevia dan lingkungan tumbuh (Kaur *et al.*, 2014). Glikosida steviol ini disintesis di daun, melibatkan organel kloroplas serta retikulum endoplasma (Bradle & Telmer, 2007). Hampir semua bagian tanaman stevia memiliki rasa manis kecuali pada bagian akarnya (Kinghorn, 2002; Yadav & Guleria, 2012). Hingga saat ini telah dikenal 34 jenis glikosida steviol pada tanaman, namun hanya 11 glikosida steviol yang umum dijumpai pada

tanaman stevia (Yadav & Guleria, 2012; Ceunen & Geuns, 2013; Prakash *et al.*, 2014). Dua senyawa utama yang sering digunakan sebagai penanda kualitas stevia adalah steviosida dan rebaudiosida A (reb A). Steviosida pada umumnya merupakan komponen utama glikosida steviol (5-10% dari bobot kering daun), disusul reb A (2-4%), reb C (1-2%) dan dulcosida A (0.4-0.7%) (Chatsudhipong & Muanprasat, 2009).

Stevia merupakan tanaman hari pendek (*short day plant*) dengan periode kritis penyinaran 12-13 jam, sehingga tanaman ini akan berbunga apabila lama penyinarannya kurang dari periode kritisnya (Ramesh *et al.*, 2006; Ceunen *et al.*, 2012). Tanaman stevia di Indonesia akan cepat berbunga karena memiliki rata-rata lama penyinaran sekitar 12 jam. Stevia umumnya dipanen ketika 5% tanaman telah berbunga. Hal ini disebabkan karena apabila tanaman telah berbunga, kandungan glikosida steviolnya akan turun (Ramesh *et al.*, 2006), sebaliknya, apabila tanaman terlalu cepat dipanen maka kandungan glikosida steviolnya masih rendah atau belum terbentuk.

Perbanyakan stevia umumnya dilakukan dengan setek karena lebih mudah dan menghasilkan tanaman yang seragam (Djajadi, 2014). Perbanyakan setek stevia melalui kultur *in vitro* telah dipelajari (Sumaryono & Sinta, 2011). Cepatnya pembungaan menyebabkan tanaman stevia di Indonesia memiliki kandungan glikosida steviol serta produktivitas per panen lebih rendah dibandingkan negara subtropis, dimana produktivitas daun kering mencapai 15-35 g/tanaman (Mishra *et al.*, 2010), 20,7 g/tanaman di India (Kumar *et al.*, 2014) dan 50-70 g/tanaman di Bulgaria (Nikolova, 2015), 45,78 g/tanaman di Amerika (Parris *et al.*, 2016), sedangkan di negara tropis seperti Brazil, produktivitas daun keringnya berkisar 8,7-43,9 g/tanaman (Pereira *et al.*, 2016). Tanaman yang lambat berbunga mampu mengakumulasi glikosida steviol lebih banyak serta biomassa lebih tinggi (Pereira *et al.*, 2016). Produktivitas daun kering stevia di Indonesia pada klon BPP 72 mencapai 2,5-3,5 ton/ha/tahun (Suhendi, 1988), sedangkan klon generasi baru memiliki produktivitas hanya 3,2-8,2 g/tanaman.

Penggunaan klon unggul stevia merupakan salah satu faktor keberhasilan budidaya stevia. Klon-klon generasi lama umumnya memiliki kandungan steviosida yang lebih tinggi dibandingkan reb A (Suhendi, 1988). Klon stevia dengan kandungan steviosida lebih tinggi umumnya memiliki rasa *bitter taste* sehingga tidak dapat digunakan secara utuh atau harus dicampur dengan pemanis lain. Reb A memiliki sedikit atau tanpa *bitter taste* sehingga lebih disukai. Hal ini memungkinkan penggunaan reb A secara tunggal. Klon generasi baru memiliki kandungan reb A lebih tinggi dibandingkan steviosida (Parris *et al.*, 2016), salah satunya adalah klon BS yang memiliki kandungan reb A tinggi (8,5%) dan steviosida rendah (2,4%).

Perakitan stevia unggul baru melalui pemuliaan konvensional terkendala oleh beberapa faktor, seperti adanya *self incompatibility* pada stevia, rendahnya kemampuan membentuk biji viable, serta rendahnya persentase perkecambahan biji (Jain *et al.*, 2014). Kendala ini dapat diatasi dengan metode lain untuk meningkatkan keragaman tanaman stevia sebagai bahan pemuliaan tanaman. Salah satunya adalah dengan induksi mutasi. Induksi mutasi stevia telah dilakukan untuk meningkatkan beberapa sifat penting seperti peningkatan kandungan steviosida dan reb A melalui iradiasi gamma dan EMS, namun steviol yang dihasilkan rendah (Khan *et al.*, 2016) dan daya hidup stevia menurun (Khalil *et al.*, 2014).

Studi tentang ploidisasi sering dikaitkan dengan ukuran morfologi suatu tanaman (Ravandi *et al.*, 2013), namun ada pula yang dikaitkan dengan metabolit yang dihasilkannya. Peningkatan ploidi dapat dilakukan dengan merendam tanaman atau bagian tanaman dalam larutan kolkisin. Kolkisin merupakan suatu senyawa yang dihasilkan oleh tanaman *Colchicum autumnale* yang menghambat pembentukan benang gelendong pada saat pembelahan sel. Senyawa ini merupakan salah satu mutagen yang menyebabkan peningkatan ploidi (jumlah set kromosom). Peningkatan ploidi (*autotetraploid*) dapat meningkatkan metabolit sekunder suatu tanaman, seperti kandungan morfin pada *Papaver somniferum* (Mishra *et al.*, 2010) dan fenilpropanoid pada *Solanum commersonii* (Caruso *et al.*, 2011). Studi metabolomik pada *Arabidopsis thaliana* dan *Pyrus communis* menunjukkan bahwa tidak semua metabolit meningkat dengan adanya peningkatan ploidi (Tsukaya *et al.*, 2015).

Studi ploidisasi pada biji stevia dengan kolkisin meningkatkan ukuran daun, ketebalan daun dan kandungan klorofil, serta mengurangi panjang internodus (Yadav *et al.*, 2013). Penggunaan biji yang beragam menyebabkan beragamnya vigor serta kandungan glikosida steviol yang dihasilkan. Perendaman kolkisin pada bagian vegetatif tanaman masih memungkinkan terjadinya khimera dimana tanaman memiliki susunan genetik berbeda, sehingga diperlukan subkultur berulang hingga stabil.

Pada penelitian ini dilakukan induksi poliploid pada klon stevia generasi baru yaitu klon BS. Tujuan penelitian ini adalah meningkatkan ploidi tanaman stevia dengan senyawa kolkisin secara *in vitro*, sebagai langkah awal untuk mendapatkan klon mutan dengan vigor tanaman yang unggul dan kadar steviosida dan reb A tinggi.

## Bahan dan Metode

### Induksi mutasi

Bahan yang digunakan adalah planlet stevia *in vitro* klon BS koleksi PPBBI (Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia) yang me-

rupakan klon stevia introduksi. Penelitian ini disusun menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan kombinasi perlakuan yaitu 5 taraf konsentrasi kolkisin (0,01; 0,02; 0,04; 0,08 dan 0,1%) dan dua durasi perendaman (48 dan 72 jam). Perendaman dalam aquades steril digunakan sebagai kontrol. Percobaan ini terdiri dari 10 kombinasi perlakuan dan 1 kontrol yang diulang sebanyak 5 kali sehingga terdapat 55 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 10 eksplan setek buku tunggal sebagai satuan amatan. Total jumlah satuan amatan adalah 550.

Sebanyak 10 buku stevia berukuran 1-1,5 cm direndam dalam larutan kolkisin dan sebagai kontrol digunakan akuades steril, dalam tabung Erlenmeyer 100 mL dengan volume kolkisin 10 mL hingga semua buku terendam, dan diinkubasi selama 48 dan 72 jam dengan digoyang di atas *shaker*. Selanjutnya tiap buku ditanam dalam media MS (Murashige & Skoog, 1962) dengan 30 g/L sukrosa, 3 g/L gelrite, tanpa zat pengatur tumbuh (eksplan yang telah direndam dalam kolkisin dan dipindahkan ke media baru disebut sebagai *mutan vegetatif 1/ MV1*). Tingkat pH medium diatur 5,7 sebelum disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 kg/cm<sup>2</sup> selama 20 menit. Kultur diletakkan pada ruang kultur terang di bawah lampu neon dengan lama penyinaran 14 jam dan suhu ruangan 24 °C .

#### *Pemeliharaan mutan putatif dan subkultur*

Stevia MV1 berumur 3 minggu setelah penanaman (MSP) disubkultur dengan memotong planlet (tunas aksilar) menjadi buku tunggal kemudian ditanam pada media yang sama sehingga didapatkan MV2. Subkultur dilakukan hingga MV4 untuk mendapatkan mutan yang stabil. Pada akhir periode (menjelang subkultur berikutnya) dilakukan pengamatan terhadap jumlah daun, jumlah tunas, jumlah buku dan jumlah akar. Diamati pula perubahan khusus yang terjadi pada tanaman mutan. Subkultur dilakukan setiap 3 minggu pada media yang sama (MS). Pada MV1 dilakukan pengamatan *Lethal Concentration 50* (LC<sub>50</sub>) dengan menghitung 50% kematian planlet akibat perendaman kolkisin. Analisis keragaman dihitung dengan menggunakan pendekatan keragaman dalam populasi genetik dengan rumus:

$$KK (\%) = \frac{\delta}{\chi} \times 100\%$$

dengan KK= Koefisien keragaman,  $\delta$ = standart deviasi,  $\chi$ = rerata.

#### *Analisis mutan putatif*

##### *a. Vigor planlet*

Pengamatan vigor planlet dilakukan pada sampel tiap perlakuan dan kontrol yang diambil secara acak pada MV5. Sebanyak 6 botol stevia berisi masing-masing 5 planlet tiap botol dianalisis dengan parameter: jumlah daun, panjang dan lebar daun, jumlah buku, jumlah akar, bobot basah, dan bobot kering.

##### *b. Analisis stomata*

Analisis stomata dilakukan pada sampel MV5 untuk setiap perlakuan dan kontrol, yang diambil secara acak. Daun diambil dari 3 planlet berbeda, posisi daun ke-3 dari pucuk, pada pukul 9.00 WIB, dan pengamatan dilakukan pada 3 bidang pandang. Daun (bagian atas) dikelupas hingga tipis (tanpa pewarnaan), kemudian diletakkan secara tepat pada kaca objek, selanjutnya diamati dengan mikroskop pada perbesaran 40x. Parameter yang diamati adalah kerapatan stomata, panjang dan lebar stomata, serta jumlah kloroplas pada sel penjaga. Jumlah kloroplas ditentukan dengan menghitung butir-butir kloroplas pada 20 sel penjaga stomata. Kerapatan stomata dihitung berdasarkan persamaan:

$$\text{Kerapatan stomata} = \frac{\text{Jumlah stomata}}{\text{Luas bidang pandang}}$$

dengan luas bidang pandang 0,19625 mm<sup>2</sup>.

#### *Analisis data*

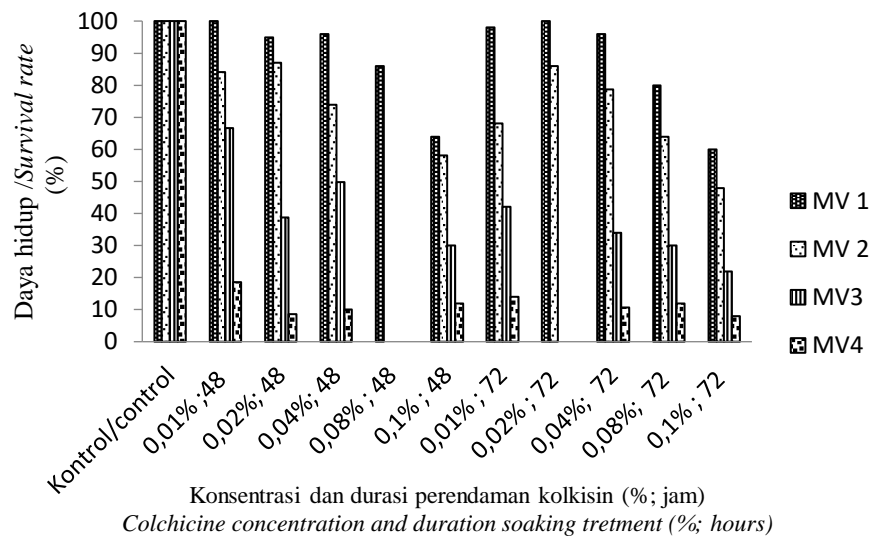
Data kuantitatif hasil pengamatan dianalisis menggunakan *Analysis of variance* (ANOVA) pada taraf nyata 5%, jika terdapat perbedaan nyata maka akan diuji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test/ DMRT*) pada taraf nyata 5%. Penentuan *Lethal Concentration 50* (LC<sub>50</sub>) pada MV1 menggunakan program *Curve-fit test analysis*.

## **Hasil dan Pembahasan**

#### *Induksi mutasi*

Pada penelitian ini dilakukan subkultur berulang hingga MV4 untuk mendapatkan mutan yang lebih stabil. Perendaman kolkisin dalam waktu yang lama dan konsentrasi tinggi menyebabkan kematian planlet terutama setelah MV2 (Gambar 1). Pada perlakuan perendaman kolkisin 0,08% selama 48 jam, seluruh planlet mengalami kematian pada MV2. Hal serupa terjadi pada perlakuan 0,02% dengan perendaman 72 jam di MV3. Daya hidup tertinggi terjadi pada kontrol, kemudian disusul dengan perlakuan perendaman kolkisin konsentrasi terendah dan durasi perendaman terendah (0,01% selama 48 jam) dengan daya hidup hingga MV 4 mencapai 18,7%.

Kolkisin merupakan mutagen yang mencegah terbentuknya benang gelendong selama pembelahan sel, karena di dalam nukleus kolkisin berikatan dengan mikrotubuli  $\alpha$  dan  $\beta$  pada saat pembelahan sel (Chaudhuri *et al.*, 2000). Kolkisin menyebabkan mutasi kromosom dimana pencegahan terbentuknya benang gelendong pada saat sel terpapar kolkisin menyebabkan kromosom pada sel yang telah mengganda tidak membelah sehingga dihasilkan sel poliploid. Perubahan jumlah materi genetik pada sel tanaman setelah perlakuan kolkisin menyebabkan terjadinya pengaturan-kembali (*rearrangement*) sel dimana sel yang mengalami mutasi harus dapat



Gambar 1. Daya hidup planlet stevia hingga MV4

Figure 1. Survival rate of stevia plantlet until MV4

menyesuaikan kondisi biologi sel dengan jumlah kromosom berbeda. Sel mutan yang tidak dapat menyesuaikan diri tidak dapat tumbuh dan akan terdeslesi selama proses pertumbuhan.

Efektivitas suatu mutagen ditentukan oleh jenis tanaman, kondisi sel, lama perendaman serta konsentrasi mutagen yang digunakan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa planlet pada perlakuan perendaman kolkisin dengan konsentrasi paling rendah dan durasi perendaman paling singkat (0,01% selama 48 jam) memiliki daya hidup paling tinggi dibandingkan perlakuan lain (selain kontrol) dengan daya hidup 18,7% pada MV4. Sebaliknya, pada konsentrasi perendaman tinggi serta durasi perendaman yang lama, planlet memiliki daya hidup sangat rendah. Hasil serupa juga dihasilkan oleh penelitian Moghbel *et al.* (2015) pada kultur *in vitro Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera dan *Carthamus tinctorius* L. di mana konsentrasi tinggi dengan perendaman yang lama menyebabkan efek toksik pada planlet.

LC<sub>50</sub> pada penelitian ini diamati pada MV1 saat semua tanaman secara langsung terpapar kolkisin. Pada LC<sub>50</sub> ini umumnya ditemukan paling banyak mutan. LC<sub>50</sub> pada faktor konsentrasi adalah 0,1% dengan model polynomial ( $R^2= 0,974$ ), persamaan  $Y=100,18-240,67x+7022,62x^2-84232,8x^3$ . Nilai LC<sub>50</sub> berbeda-beda pada tiap spesies tanaman serta bagian atau tahapan perkembangan tanaman yang terpapar mutagen. Pada tanaman anggrek *Dendrobium lasianthera*, nilai LC<sub>50</sub> adalah 0,122% (Nugroho, 2015), sedangkan pada *Dendrobium sylvanum* memiliki LC<sub>50</sub> pada konsentrasi kolkisin 0,054-0,069% (Musalamah, 2018).

Kematian planlet diawali dengan terhambatnya pertumbuhan planlet, diikuti oleh perubahan planlet menjadi coklat (*browning*), selanjutnya sel mati (Gambar 2a). Perubahan khusus juga terjadi

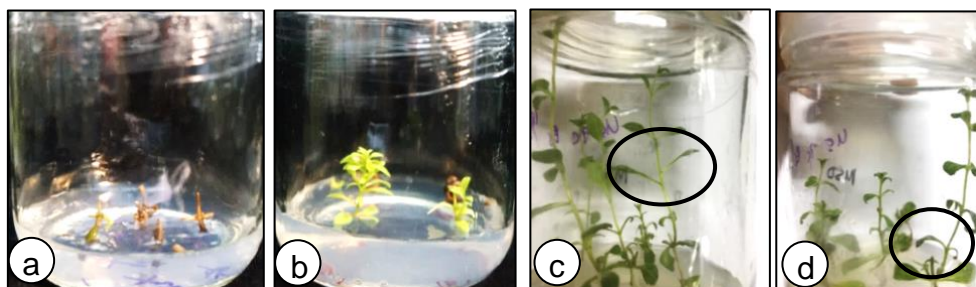
pada planlet yang direndam dalam kolkisin seperti planlet menjadi kerdil (Gambar 2b), pertumbuhan daun tidak sejajar (Gambar 2c), serta luasan daun yang berhadapan memiliki ukuran yang berbeda (Gambar 2d). Pertumbuhan abnormal akibat perlakuan kolkisin pernah dilaporkan, seperti tidak tumbuhnya daun dan protokorm yang berakar (Azmi *et al.*, 2016), pigmentasi berbeda, serta variasi ukuran dan bentuk daun (Kharde *et al.*, 2017; Lehrer *et al.*, 2008).

Pada MV1, semua planlet yang direndam dalam kolkisin memiliki tingkat pertumbuhan rendah (Tabel 1-4). Pada tahap ini hanya perlakuan perendaman 0,01% dan 0,02% selama 48 saja yang telah menunjukkan tanda-tanda pertumbuhan yaitu dengan tumbuhnya akar. Pemulihan sel (*cell recovery*) pada perlakuan tersebut cepat terjadi. Pertumbuhan paling lambat terdapat pada perlakuan perendaman kolkisin 0,08% selama 48 jam. Pada MV3, pertumbuhan planlet dengan perlakuan perendaman kolkisin 0,04% 48 jam, 0,08% 48 jam, 0,01% 72 jam serta 0,1% 72 jam mulai tumbuh dengan baik ditandai dengan telah munculnya akar serta bertambahnya jumlah daun. Sedangkan pada perlakuan lain belum mengalami pertumbuhan, bahkan pada perlakuan perendaman 0,02% selama 72 jam planlet menjadi *browning* dan nekrosis. Pada MV4 (Tabel 1- 4 dan Gambar 3) semua perlakuan perendaman kolkisin telah tumbuh dengan baik ditandai dengan munculnya akar, peningkatan jumlah daun serta jumlah ruas planlet, bahkan pada perlakuan perendaman kolkisin 0,04% selama 72 jam memberikan jumlah tunas lebih banyak dibandingkan kontrol.

Nilai KK menggambarkan keragaman pada suatu populasi. Pada penelitian ini terlihat bahwa nilai KK lebih tinggi dibandingkan kontrol. Induksi mutasi bertujuan meningkatkan keragaman, sehingga nilai KK pada populasi yang beragam tinggi. Pada penelitian ini menunjukkan

bahwa aplikasi kolkisin pada setek *in vitro* stevia meningkatkan keragaman. Semakin tinggi konsentrasi kolkisin serta semakin lama durasi perendaman kolkisin, semakin lama pula pemulihan (*recovery*) sel tanaman. Sebelum pembelahan sel, sel tanaman dalam keadaan interfase. Kondisi ini terbagi dalam 3 bagian yaitu G1 dimana terjadi sintesis bahan-bahan untuk

replikasi DNA, S (saat replikasi materi genetik DNA), serta G2 (sintesis protein dan bahan lain yang diperlukan saat pembelahan sel). Sel akan membelah apabila kondisi lingkungan mendukung, apabila kondisi lingkungan tidak mendukung sel akan berhenti berproses pada G1, bahkan memasuki kondisi *resting state* pada G0 (G zero) (Syukur *et al.*, 2013).



Gambar 2. Morfologi planlet stevia pada MV 4: a) planlet mencoklat, b) planlet kerdil, c) posisi daun berseling, d) ukuran daun yang berhadapan berbeda.

Figure 2. *Stevia* plantlets morphology on MV 4: a) browning, b) stunted plantlets, c) position of leaves was intermittent, d) different faceted leaf sizes.

Tabel 1. Perbandingan jumlah daun planlet stevia pada MV1 hingga MV4 masing-masing setelah 3 minggu setelah tanam  
Table 1. Leaves number comparison of stevia plant let between MV1 until MV4 each on 3 weeks after culture

Perlakuan kolkisin (%; jam)/ <i>Colchicine</i> <i>treatment</i> (%; hours)	Jumlah daun/ <i>Leaves number</i>							
	MV1		MV2		MV3		MV4	
	Rerata/ <i>Average</i>	KK/ <i>CV</i> (%)	Rerata/ <i>Average</i>	KK/ <i>CV</i> (%)	Rerata/ <i>Average</i>	KK/ <i>CV</i> (%)	Rerata/ <i>Average</i>	KK/ <i>CV</i> (%)
Kontrol/ <i>Control</i>	13,9	17,4	10,6±0,9	8,1	13,4±1,3	9,3	11,2±1,5	13,4
0,01; 48	3,2	24,7	2,9±1,6	56,0	4,1±3,6	88,1	5,9±3,8	64,7
0,02; 48	2,9	14,4	1,2±0,9	73,8	2,9±2,9	99,7	8,0±5,4	68,0
0,04; 48	2,8	46,3	0,8±0,9	113,2	1,8±1,7	91,9	10,3±10,1	98,2
0,08; 48	0,2	149,1	-	-	-	-	-	-
0,1; 48	1,5	39,3	0,3 ±0,3	94,8	4,1±4,3	103,7	6,7±6,3	93,7
0,01; 72	2,1	49,8	1,6 ±1,0	58,3	3,3±3,7	112,0	8,6±5,1	59,6
0,02; 72	1,6	19,2	0,4±0,9	223,6	-	-	-	-
0,04; 72	1,9	32,0	0,6±0,7	120,8	2,08±9,6	160,1	11,0±4,9	44,1
0,08; 72	1,4	78,9	0,3 ±0,3	126,4	0,5±1,0	200,0	3,5±6,1	173,2
0,1; 72	1,1	157,4	0,5 ±0,7	125,3	1,9±0,9	173,2	8,0±8,0	100,0

Keterangan: - = eksplan mati, KK= Koefisien keragaman/ Notes: - = died explant, CV= coefficient of variation

Tabel 2 Perbandingan jumlah tunas stevia pada generasi MV1 hingga MV4 masing-masing setelah 3 MSP  
Table 2 *Stevia* shoot number comparison between MV1 until MV4 each on 3 weeks after culture

Perlakuan kolkisin (%; jam)/ <i>Colchicine</i> <i>treatment</i> (%; hours)	Jumlah tunas/ <i>Shoot number</i>							
	MV1		MV2		MV3		MV4	
	Rerata/ <i>Average</i>	KK/ <i>CV</i> (%)	Rerata/ <i>Average</i>	KK/ <i>CV</i> (%)	Rerata/ <i>Average</i>	KK/ <i>CV</i> (%)	Rerata/ <i>Average</i>	KK/ <i>CV</i> (%)
Kontrol/ <i>Control</i>	1,5	14,5	1,4±0,2	13,5	1,3±0,2	15,5	1,2±0,2	20,2
0,01; 48	1,1	11,9	1,1±0,1	12,1	1,0±0,1	6,7	1,3±0,4	28,8
0,02; 48	1,0	0,0	1,0±0,1	5,3	1,0±0,1	6,4	1,3±0,2	15,1
0,04; 48	1,0	4,4	1,1±0,1	6,7	1,1±0,1	7,8	1,1±0,1	7,2
0,08; 48	1,0	0,0	-	-	-	-	-	-
0,1; 48	1,0	0,0	1,1±0,1	8,2	1,0±0,0	0,0	1,1±0,1	11,1
0,01; 72	1,1	7,7	1,0±0,0	4,4	1,3±0,3	25,8	1,3±0,0	3,8
0,02; 72	1,0	0,0	1,0±0,0	0,0	-	-	-	-
0,04; 72	1,0	0,0	1,1±0,1	9,1	1,7±1,3	79,3	1,7±0,3	17,9
0,08; 72	1,0	0,0	1,0±0,0	0,0	1,0±0,0	0,0	1,0±0,0	0,0
0,1; 72	1,0	0,0	1,0±0,1	6,1	1,3±0,4	34,6	1,3±0,2	16,3

Keterangan: - = eksplan mati, KK= Koefisien keragaman/ Notes: - = died explant, CV= coefficient of variation

Tabel 3 Perbandingan jumlah akar stevia pada generasi MV1 hingga MV4 masing-masing setelah 3 MSP

Table 3 *Stevia* root number comparison between MV1 until MV4 each on 3 weeks after culture

Perlakuan kolkisin (%; jam)/ <i>Colchicine</i> <i>treatment</i> (%; hours)	Jumlah akar/ Root number							
	MV1		MV2		MV3		MV4	
	Rerata/ Average	KK/ CV (%)	Rerata/ Average	KK/ CV (%)	Rerata/ Average	KK/ CV (%)	Rerata/ Average	KK/ CV (%)
Kontrol/ <i>Control</i>	4,1	24,3	5,4±0,8	15,2	4,5±1,0	22,1	4,5±0,8	16,9
0,01; 48	0,2	223,6	0,1±0,5	101,9	0,5±0,5	98,7	1,5±1,4	91,5
0,02; 48	0,6	223,6	0,0±0,0	0,0	2,2±0,2	11,0	2,2±1,6	72,7
0,04; 48	0,0	223,6	0,0±0,0	223,6	0,2±0,3	223,6	1,4±1,3	97,3
0,08; 48	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-
0,1; 48	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	1,0±0,0	223,6	1,8±1,6	87,7
0,01; 72	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,4±0,9	199,2	1,2±2,1	173,2
0,02; 72	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	-	-	-	-
0,04; 72	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,8±0,9	108,8
0,08; 72	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	1,1±1,9	173,2
0,1; 72	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	1,4±3,1	223,6	2,8±2,8	100,0

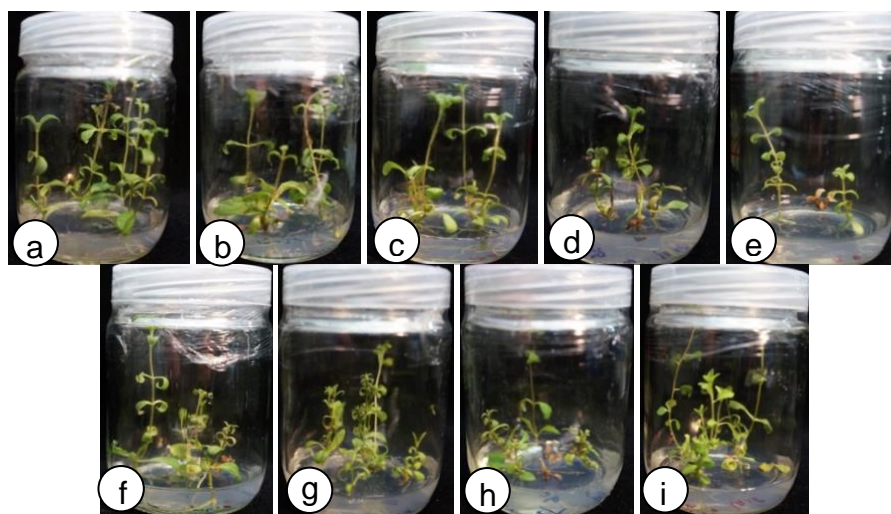
Keterangan: - = eksplan mati, KK= Koefisien keragaman/ Notes: - = died explant, CV= coefficient of variation

Tabel 4 Perbandingan jumlah buku stevia pada generasi MV1 hingga MV4 masing-masing setelah 3 MSP

Table 4 *Stevia* nodes number comparison between MV1 until MV4 each on 3 weeks after culture

Perlakuan kolkisin (%;jam)/ <i>Colchicine</i> <i>treatment</i> (%; hours)	Jumlah buku/ Nodes numbers							
	MV1		MV2		MV3		MV4	
	Rerata/ Average	KK/ CV (%)	Rerata/ Average	KK/ CV (%)	Rerata/ Average	KK/ CV (%)	Rerata/ Average	KK/ CV (%)
Kontrol	7,0	17,3	5,4±0,4	8,0	6,7±0,7	9,6	5,6±0,7	13,2
0,01; 48	1,8	18,7	2,0±0,8	36,9	3,0±1,5	49,4	4,0±0,7	18,4
0,02; 48	1,1	38,9	1,6±0,9	37,6	2,2±1,3	60,2	4,3±2,3	52,4
0,04; 48	1,7	36,5	1,3±0,3	26,9	1,6±0,6	36,7	5,5±4,7	86,0
0,08; 48	1,0	0,0	-	-	-	-	-	-
0,1; 48	1,1	9,5	1,1±0,1	8,9	2,7±2,5	91,3	3,8±2,7	69,3
0,01; 72	1,5	34,1	1,5±0,3	23,1	2,6±1,7	70,0	4,6±2,3	49,3
0,02; 72	1,2	12,3	1,0±0,0	0,0	-	-	-	-
0,04; 72	1,2	21,2	1,2±0,3	22,2	3,6±4,7	128,8	5,7±2,3	40,4
0,08; 72	1,2	25,7	1,1±0,1	9,5	1,0±0,0	0,0	2,4±2,5	101,5
0,1; 72	1,3	43,3	1,1±0,3	22,9	3,5±4,3	123,7	4,5±3,5	77,8

Keterangan: - = eksplan mati, KK= Koefisien keragaman/ Notes: - = died explant, CV= coefficient of variation



Gambar 3. Planlet stevia pada MV4, a) Kontrol, dan perlakuan perendaman kolkisin b) 0,01% 48 jam, c) 0,02% 48 jam, d) 0,04% 48 jam, e) 0,1% 48 jam, f) 0,01% 72 jam, g) 0,04% 72 jam, h) 0,08% 72 jam, i) 0,1% 72 jam.

Figure 3. *Stevia* plantlets on MV4, a) Control, and colchicine soaking treatment b) 0,01% 48 h, c) 0,02% 48 h, d) 0,04% 48 h, e) 0,1% 48 h, f) 0,01% 72 h, g) 0,04% 72 h, h) 0,08% 72 h, i) 0,1% 72 h.

## Analisis mutan putatif

## a. Vigor planlet in vitro

Berdasarkan planlet pada MV5, planlet dengan perlakuan perendaman kolkisin memiliki vigor dan lebih baik (jumlah akar, bobot basah dan bobot kering) dibandingkan kontrol, kecuali pada perlakuan perendaman 0,08% selama 72 jam (Tabel 5). Jumlah daun, jumlah tunas, serta jumlah buku tidak berbeda nyata berdasarkan uji F. Pada MV5 rata-rata planlet memiliki 16-19 helai daun dengan diameter batang 0,09-1,1 cm.

Salah satu ciri tanaman dengan kromosom lebih banyak adalah terjadinya peningkatan vigor. Tanaman poliploid umumnya memiliki ciri morfologi yang lebih besar dibandingkan tanaman diploid. Penelitian yang dilakukan Mahyuni *et al.* (2015) menunjukkan bahwa perendaman kolkisin menyebabkan peningkatan bobot basah dan bobot kering tajuk tanaman binahong. Peningkatan jumlah kromosom menyebabkan peningkatan ekspresi gen yang terekspresi pada vigor tanaman.

## b. Stomata

Analisis stomata daun planlet stevia menunjukkan adanya perbedaan pada perlakuan perendaman kolkisin dibandingkan dengan kontrol (Tabel 6, Gambar 4). Daun tanaman kontrol memiliki kerapatan stomata paling tinggi, panjang dan lebar stomata paling kecil serta jumlah kloroplas paling sedikit. Hal sebaliknya terjadi pada tanaman dengan perlakuan kolkisin. Pada penelitian ini terjadi peningkatan jumlah kloroplas pada sel penjaga 1,18-2,08 kali, peningkatan panjang stomata 1,01-2,11 kali, peningkatan lebar stomata 0,93-1,55 kali dan terjadi penurunan kerapatan stomata 0,16-0,70 kali.

Sel dengan ploidi lebih tinggi umumnya ditandai dengan peningkatan ukuran stomata, peningkatan jumlah kloroplas pada sel penjaga dengan kerapatan stomata lebih rendah (Omidbaigia *et al.*, 2010; Padoan *et al.*, 2013; Moghbel *et al.*, 2015). Peningkatan ploidi menyebabkan peningkatan *copy gen* yang antara lain terekspresi pada stomata.

Metode penghitungan kromosom dapat dilakukan secara langsung yaitu dengan menghitung jumlah kromosom pada ujung akar suatu tanaman, dapat pula dilakukan secara tidak langsung (*indirect*). Penghitungan kerapatan stomata jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata, pengukuran panjang serta lebar stomata merupakan beberapa metode tidak langsung penentuan ploidi suatu tanaman. Penelitian yang dilakukan Winarto *et al.* (2010) pada tanaman anthurium menunjukkan bahwa jumlah kloroplas berkolerasi positif dengan ploidi tanaman, sedangkan kerapatan stomata berkolerasi negatif dengan ploidi tanaman.

Peningkatan ploidi pada tanaman umumnya ditandai dengan peningkatan ukuran sel, stomata, bunga, buah, biji dan ukuran tanaman. Studi mengenai peningkatan ploidi pada tanaman membuka peluang untuk dihasilkannya tanaman dengan sifat yang tidak terlihat dari tetua diploidnya, serta dimungkinkan memiliki peningkatan penyebaran habitat lebih luas (Caruso *et al.*, 2011). Pada penelitian ini terlihat bahwa pada perendaman kolkisin selama 48 jam dengan konsentrasi 0,01-0,04% menyebabkan rerata ukuran stomata yang lebih besar, dengan jumlah kloroplast lebih tinggi dan kerapatan stomata rendah dibandingkan dengan durasi perendaman yang lebih lama.

Tabel 5. Vigor stevia *in vitro* pada MV5Table 5. In vitro vigor *Stevia* on MV5

Konsentrasi kolkisin; lama perendaman <i>Colchicine</i> concentration (%); soaking duration (hours)	Jumlah daun <i>Leaves number</i>	Jumlah tunas <i>Shoot number</i>	Jumlah akar <i>Root number</i>	Jumlah buku <i>Node number</i>	Bobot basah <i>Fresh weight</i> (g)	Bobot kering <i>Dry weight</i> (g)			
Kontrol/ <i>Control</i>	18,8	1,0	4,0	ab	8,1	0,154	c	0,0148	ab
0,01; 48	16,5	1,2	3,4	ab	7,5	0,191	bc	0,0209	ab
0,02; 48	18,1	1,3	4,7	b	8,5	0,225	ab	0,0183	ab
0,04; 48	18,5	1,2	5,6	a	8,4	0,261	a	0,0238	a
0,1; 48	18,8	1,1	4,9	a	9,1	0,218	ab	0,0230	ab
0,01; 72	17,7	1,1	3,5	ab	7,9	0,192	bc	0,0145	b
0,04; 72	17,5	1,1	3,8	ab	8,2	0,189	bc	0,0150	ab
0,08; 72	16,0	1,1	1,5	b	7,3	0,146	c	0,0147	ab
0,1; 72	18,7	1,2	4,3	a	8,5	0,205	abc	0,0179	ab
Uji F/ <i>F test</i>	tn/ns	tn/ns	*	tn/ns	*	*		*	

tn = tidak nyata, ns = not significance

\*) Angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha \leq 0,05$ .

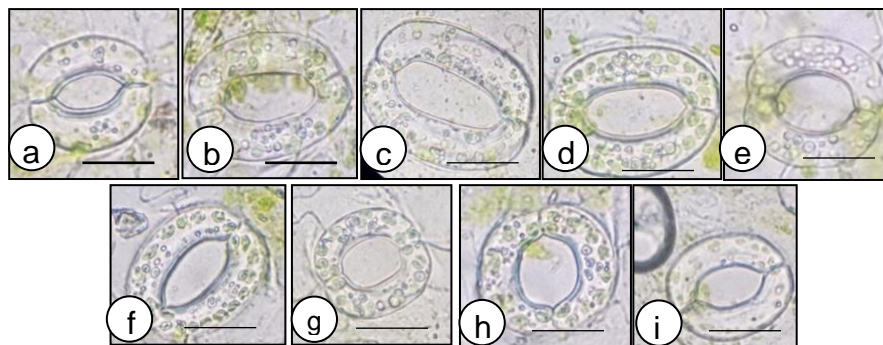
\*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at  $\alpha \leq 0,05$ .



Tabel 6. Kerapatan stomata, ukuran stomata, serta jumlah kloroplas pada planlet mutan dan kontrol

Table 6. Stomata density, stomata size, and chloroplast number on mutant and control plantlets

Konsentrasi kolkisin; lama perendaman (%; jam) <i>Colchicine concentration; soaking duration (%; hours)</i>	Jumlah kloroplas <i>Chloroplast number</i>	Panjang stomata <i>Stomata length</i> ( $\mu\text{M}$ )	Lebar stomata <i>Stomata width</i> ( $\mu\text{M}$ )	Kerapatan stomata <i>Stomata density</i>
Kontrol/ <i>Control</i>	19,55 $\pm$ 2,14	31,45 $\pm$ 3,86	34,07 $\pm$ 3,10	250,00 $\pm$ 26,53
0,01%; 48	27,85 $\pm$ 2,16	50,09 $\pm$ 4,81	43,27 $\pm$ 3,31	45,76 $\pm$ 10,64
0,02%; 48	39,75 $\pm$ 4,53	66,28 $\pm$ 8,34	52,76 $\pm$ 5,89	40,76 $\pm$ 8,07
0,04%; 48	40,25 $\pm$ 3,86	42,53 $\pm$ 13,44	39,29 $\pm$ 9,56	62,84 $\pm$ 9,53
0,1%; 48	35,05 $\pm$ 4,23	32,52 $\pm$ 2,74	34,92 $\pm$ 2,25	176,07 $\pm$ 18,74
0,01%; 72	34,85 $\pm$ 2,58	34,27 $\pm$ 4,22	36,92 $\pm$ 5,88	112,10 $\pm$ 19,40
0,04%; 72	23,50 $\pm$ 2,31	33,92 $\pm$ 5,13	36,92 $\pm$ 3,20	156,25 $\pm$ 15,70
0,08%; 72	36,85 $\pm$ 4,06	32,76 $\pm$ 3,33	34,23 $\pm$ 3,14	124,55 $\pm$ 40,53
0,1%; 72	23,00 $\pm$ 3,09	33,57 $\pm$ 3,46	31,81 $\pm$ 2,37	107,01 $\pm$ 21,92



Gambar 4. Stomata stevia *in vitro*, a) kontrol (jumlah kloroplas= 20) dan perlakuan perendaman kolkisin b) 0,01% 48 jam (jumlah kloroplas= 34), c) 0,02% 48 jam (jumlah kloroplas= 43), d) 0,04% 48 jam (jumlah kloroplas= 44), e) 0,1% 48 jam (jumlah kloroplas= 28), f) 0,01% 72 jam (jumlah kloroplas= 36), g) 0,04% 72 jam (jumlah kloroplas= 28), h) 0,08% 72 jam (jumlah kloroplas= 30), i) 0,1% 72 jam (jumlah kloroplas= 20). Bar= 2  $\mu\text{m}$ .

Figure 4. Stomata stevia *in vitro*, a) control (chloroplast number= 20) and colchicine soaking treatment (b) 0.01% 48 h (chloroplast number=34), c) 0.02% 48 h (chloroplast number= 43), d) 0.04% 48 h (chloroplast number= 44), e) 0.1% 48 h (chloroplast number= 28), f) 0.01% 72 h (chloroplast number= 36, g) 0.04% 72 h (chloroplast number= 28, h) 0.08% 72 h (chloroplast number= 30), i) 0.1% 72 h (chloroplast number= 20). Bar= 2  $\mu\text{m}$ .

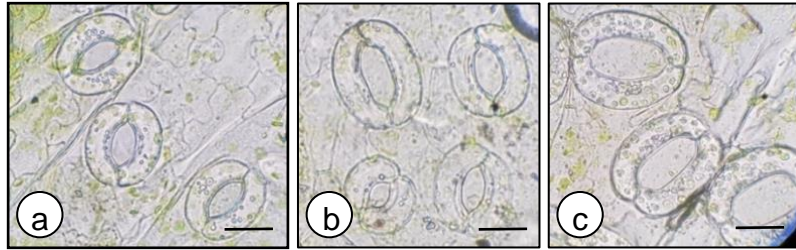
Penelitian Moghbel *et al.* (2015) pada kultur *in vitro Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera dan *Carthamus tinctorius* L. menunjukkan terjadinya peningkatan konsentrasi DNA pada perlakuan perendaman kolkisin selama 24 jam, sedangkan pada perendaman yang lebih lama konsentrasi DNA tidak meningkat signifikan. Efektivitas induksi poliploid pada konsentrasi kolkisin rendah juga terjadi pada kultur *in vitro Aframomum corrorima* (Wannakrairoj & Tefera, 2013).

*Pendugaan khimera pada MV5*

Sampel yang digunakan pada analisis ini sebanyak 9 bidang pandang dari 3 planlet tiap perlakuan. Hasil pengamatan pada daun stevia MV5 menunjukkan masih terdapatnya khimera pada beberapa planlet (Gambar 5). Planlet yang

sudah stabil memiliki ukuran stomata maupun sudah stabil memiliki ukuran stomata maupun jumlah kloroplas yang seragam; kondisi sebaliknya terjadi pada planlet khimera. Planlet tanpa khimera memiliki ukuran dan jumlah kloroplas seragam, yang terlihat bahwa pada kontrol (Gambar 5a), sedangkan pada perlakuan perendaman kolkisin ditemukan sel khimera yang ditandai dengan perbedaan ukuran stomata serta jumlah kloroplas (Gambar 5b). Meskipun demikian telah didapatkan pula planlet dengan genetik stabil setelah perendaman kolkisin (Gambar 5c). Pada penelitian ini diduga sebanyak 44,46% stomata seragam, diduga sudah tidak mengalami khimera, sedangkan 55,54% masih khimera





Gambar 5. Khimera stomata daun pada MV5. a) kontrol dengan jumlah kloroplas (19) dan ukuran stomata seragam, b) Khimera pada perlakuan perendaman kolkisin 0,1% selama 72 jam, c) Stomata pada mutan telah stabil dengan perlakuan perendaman kolkisin 0,02% selama 48 jam dengan ukuran stomata seragam. Bar= 2  $\mu$ m.

Figure 5. Leaves stomata chimera on MV 5. a) Control with uniform chloroplast (19) and stomata size, b) chimera on stevia leaves treated by 0,02% colchicine for 72 h, c) Stomata on solid mutant treated with 0.02% colchicine for 48 h with uniform stomata size. Bar= 2  $\mu$ m.

Subkultur berulang perlu dilakukan untuk menghasilkan mutan yang mantap (*solid mutant*). *Solid mutant* ditandai dengan dihasilkannya tanaman dengan genetik seragam, yang berbeda dengan tanaman kontrol. Umumnya subkultur tanaman dilakukan 4-7 kali untuk menyelaksi khimera dan mendapatkan *solid mutant*. Pada tanaman anggur, dengan subkultur hingga 4-6 generasi mampu menurunkan khimera (Chang *et al.*, 2014).

### Kesimpulan

Sel tanaman stevia yang terpapar kolkisin membutuhkan waktu untuk pulih kembali (*recovery*). Semakin tinggi konsentrasi kolkisin dan lama perendaman semakin lama waktu yang dibutuhkan tanaman stevia untuk pulih yakni hingga MV4. Perendaman kolkisin diduga meningkatkan keragaman genetik stevia yang ditandai dengan adanya keragaman pada morfologi tanaman *in vitro*, ukuran stomata, kerapatan stomata, serta jumlah kloroplas pada sel penjaga. Perendaman stevia pada kolkisin selama 48 jam dengan konsentrasi 0,01%-0,04% diduga menghasilkan tanaman dengan ploidi lebih tinggi dibandingkan kontrol.

### Saran

Disarankan untuk melakukan subkultur hingga 3-4 kali lagi sebelum dilakukan uji sitologi untuk menghilangkan khimera pada MV5.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), Kementerian Keuangan, Republik Indonesia atas dana penelitian yang diberikan.

### Daftar Pustaka

Azmi TKK, D Sukma, SA Aziz & M Syukur (2016). Polyploidy induction of moth orchid (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) by

colchicine treatment on pollinated flowers. *J Agric Sci* 11(2), 62-73.

Caruso I, L Lepore, N De Tommasi, FD Piaz, L Frusciantea, R Aversanoa, R Garramonea & D Carputo (2011). Secondary metabolite profile in induced tetraploids of wild *Solanum commersonii* Dun. *Chem & Biodiv* 8, 2226-2237.

Ceunen S & JMC Geuns (2013). Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function. *J Nat Prod* 76, 1201-1228.

Ceunen S, S Werbrouck & JMC Geuns (2012). Stimulation of steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* by red LED light. *J Plant Physiol* 169, 749-752.

Chang YY, X Ji, JL Zhu & Y Hao (2014). Poliploidy induction of mutation by using colchicine on tube seedling of Victoria grape. *Acta Hort* 1046, 265-270.

Chatsudhipong C & C Muanprasat (2009). Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharm & Ther* 121, 41-54.

Chaudhuari, AR, Seetharamalu P, Schwarz PM, Hausheer FH & Luduena RR (2000). The interaction of the B-ring of colchicine with  $\alpha$ -tubulin: A novel footprinting approach. *J Mol Biol* 303, 679-692.

Djajadi (2014). Pengembangan tanaman pemanis *Stevia rebaudiana* (Bertoni) di Indonesia. *Perspektif* 13(1), 25-33.

Jain P, S Kachhwaha, SL Kothari (2014). Biotechnology and metabolic engineering of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: perspective and possibilities. *Int J LifeSc Bt & Pharm Res* 3(3), 1-23.

Kaur G, V Pandhair & GS Cheema (2014). Extrac-

- tion and characterization of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J Med Plant Stu* 2(5), 41-45.
- Khalil SA, N Ahmad & R Zair (2014). Effect of different propagation techniques and gamma irradiation on major steviol glycoside contents in *Stevia rebaudiana*. *J Anim Plant Sci* 24(6), 1743-1751.
- Khan SA, L Rahman, R Verma, K Shanker (2016). Physical and chemical mutagenesis in *Stevia rebaudiana*: variant generation with UGT expression and glycosidic profile but with low photosynthetic capabilities. *Acta Physiol Plant* 38 (4), 1-12
- Mishra BK, Pathak S, Sharma A, Trivedi PK & Shukla S (2010). Modulated gene expression in newly synthesized auto-tetraploid of *Papaver somniferum* L. *South African J Bot* 76, 447-452.
- Moghbel N, MK Borujeni, Franc & O Bernard (2015). Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. *J Gen Engin Biotechnol* 13, 1-6.
- Musalamah (2018). Mutasi induksi *Dendrobium sylvanum* var flava menggunakan kolkisin secara *in vitro* [Tesis], IPB, Bogor.
- Niklova E (2015). Development in the production of natural sweetener (*Stevia rebaudiana*) in Bulgaria. *J Environ Agric Sci* 3, 61-71.
- Omidbaigia R, M Mirzaee, ME Hassanib & MS Moghadamc (2010). Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International J Plant Prod* 4(2), 87-98.
- Padoan D, A Mossad, B Chiancone, MA Germana & PSSV Khan (2013). Ploidy levels in *Citrus clementine* affects leaf morphology, stomatal density and water content. *Theor and Exp Plant Physiol* 25(4), 283-290.
- Parris CA, CC Shock & M Qian (2016). Dry leaf and steviol glycoside productivity of *Stevia rebaudiana* in the Western United States. *Hort Sci* 51(10),1220-1227.
- Pereira C, L Storck, SJ Lopes, TN Martin, DA Bisognin (2016). Dry biomass and glycoside yield from *Stevia rebaudiana* leaves under different harvesting times. *J Biosci* 32(6), 1462-1471
- Ramesh K, V Singh & NM Mageji (2006). Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: a comprehensive review. *Advance in Agronomy* 89, 137-177.
- Ravandi EG, Ferezanjad F, Zolala J & Dehgan E (2013). The effects of chromosome-doubling on selected morphological and phytochemical characteristics of *Cichorium intybus* L. *J Hort Sci Biotech* 88 (6), 701-709.
- Suhendi D (1988). Seleksi massa tanaman *Stevia rebaudiana* Bertoni M. *Menara Perkebunan* 56(4), 93-95.
- Sumaryono & MM Sinta (2011). Peningkatan laju multiplikasi tunas dan keragaan planlet *Stevia rebaudiana* pada kultur *in vitro*. *Menara Perkebunan* 79(2), 49-56
- Syukur M, S Sastrosumarjo, Y Wahyu, SI Aisyah, S Sujiprihati & R Yuniati (2013). *Sitogenetika Tanaman*. Bogor, IPB Press.
- Tsukaya H, Y Sawada, A Oikawa, K Shiratake, K Isuzugawa, K Saito & MY Hirai (2015). Intraspecific comparative analyses of metabolites between diploid and tetraploid *Arabidopsis thaliana* and *Pyrus communis*. *New Negatives in Plant Sci* 1(2), 53-61.
- Wannakrairoj S & W Tefera (2013). *In vitro* chromosome doubling in korarima [*Aframomum corrorima* (Braun) PCM Jansen] using colchicine and orizalin. *Kasetsart J* 47(5), 684-694.
- Winarto B, NA Mattjik, JAT da Silva, A Purwito & B Marwoto (2010). Ploidy screening of anthurium (*Anthurium adreanum* Linden ex Andre) regenerants derived from anther culture. *Sci Hort* 127, 86- 90.
- Yadav AK, S Singh, SC Yadav, D Dhyani, G Bhardwaj, A Sharma & B Singh (2013). Induction and morpho-chemical characterization of *Stevia rebaudiana* colchiploids. *Indian J Agric Sci* 83 (2), 159-165.