

# KONSERVASI *Paphiopedilum supardii* Braem & Loeb DENGAN METODE PENYIMPANAN BIJI DAN PERBANYAKAN SECARA *IN VITRO*

## Conservation of *Paphiopedilum supardii* Braem & Loeb by Seed Storage and *In Vitro* Propagation

Elizabeth Handini<sup>\*</sup>, D.M. Puspitaningtyas dan R. Vitri Garvita

Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, LIPI Jl. Ir. H. Juanda 13, Bogor 16003

\*Email: lizahandini@yahoo.com

Diterima/Received: 9 Maret 2016; Disetujui/Accepted: 2 Juni 2016

### Abstract

*Paphiopedilum supardii* Braem & Loeb is one of Slipper Orchids from Kalimantan, which is included in Appendix I of CITES. It is a critically endangered orchid with restricted habitat endemic to Kalimantan, found growing at altitude of 600-900 m above sea level. In Indonesia, this species is categorized as the priority species for conservation. The aim of this research was to conserve this orchid species through seed storage method in deep freezer (-20 °C) then evaluate the seed germination and growth on some medium composition. Four different media composition were used to test the germination i.e. Knudson C with micro nutrient (KCA), modified Knudson C (KC), modified Vacin & Went (VW) and modified leaf fertilizer (HS). Seed viability test was carried out in 0, 1, 2, 3, 6, 9 and 12 months after storage. The result showed that the seeds of *Paphiopedilum supardii* were able to germinate in four different germination medium after 12 months of storage. The germination test showed that Knudson C medium with micronutrient (KCA) resulted on the best performance of green *protocorm*, while the other media tend to produce brown *protocorm*. Unfortunately, KCA gave the lowest percentage of germination. Furthermore, subculture of *protocorm* for multiplication and rooting phase was the best in Knudson C medium with addition of both micronutrient and organic materials.

**Keywords:** *in vitro* medium, orchid, *Paphiopedilum supardii*, *protocorm*, seed storage.

### Abstrak

*Paphiopedilum supardii* Braem & Loeb adalah salah satu anggrek sepatu atau anggrek kantong semar endemik Kalimantan. Anggrek langka yang terancam punah ini termasuk dalam Appendix I CITES. Anggrek ini tumbuh pada ketinggian 600-900 m di atas permukaan laut. Di Indonesia, anggrek ini dikategorikan sebagai spesies prioritas untuk konservasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melestarikan spesies anggrek *P. supardii* Braem & Loeb melalui penyimpanan biji pada suhu -20 °C. Percobaan dilakukan pada pengujian viabilitas biji setelah penyimpanan pada empat media. Media yang digunakan untuk menguji perkecambahan yaitu Knudson C dengan mikro nutrisi (KCA), modifikasi Knudson C (KC), modifikasi Vacin & Went (VW) dan

modifikasi pupuk daun (HS). Uji viabilitas biji dilakukan dengan interval waktu 0, 1, 2, 3, 6, 9 dan 12 bulan setelah penyimpanan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biji *P. supardii* mampu berkecambah pada empat media yang diujikan sampai jangka waktu penyimpanan 12 bulan. Media perkecambahan terbaik adalah Knudson C dengan penambahan mikronutrien (KCA) dengan *protocorm* yang tumbuh sempurna berwarna hijau, sedangkan media lain menghasilkan *protocorm* yang berwarna coklat. Namun di sisi lain, KCA memberikan persentase perkecambahan terendah. Media terbaik subkultur *protocorm* untuk fase perbanyakan dan pengakaran adalah media Knudson C dengan penambahan mikronutrien dan bahan organik (air kelapa dan ekstrak taoge).

**Kata Kunci : anggrek, media in vitro, *Paphiopedilum supardii*, penyimpanan benih, *protocorm*,**

## PENDAHULUAN

*Paphiopedilum* merupakan salah satu marga anggrek yang sangat berharga di bidang hortikultura. Anggrek *Paphiopedilum* dalam bidang perdagangan internasional, masuk dalam Appendix 1 CITES (Risna et al., 2010). Anggrek dari marga ini telah banyak dibudidayakan dan bahkan sudah banyak hibrida atau silangan yang dihasilkan. Anggrek ini tumbuh tersebar di India, China, Asia Tenggara, Papua New Guinea dan Kepulauan Salomon. Spesies baru dari marga ini banyak ditemukan di daerah Kalimantan (Indonesia) dan China (Banks, 2004).

Eksplorasi anggrek yang berlebihan oleh para pemburu anggrek, serta kerusakan habitat karena kegiatan lainnya, menyebabkan jenis-jenis anggrek ini menjadi langka dan terancam punah (Rankou dan O'Sullivan, 2015). Perbanyakan anggrek langka *Paphiopedilum* sudah merupakan tugas prioritas Kebun Raya sebagai lembaga konservasi. Perbanyakan beberapa spesies *Paphiopedilum* yang telah dikembangkan oleh Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Raya Bogor sudah pernah dilaporkan oleh Handini dan Mursidawati (2008) antara lain: *P. glaucophyllum*, *P. primulinum*, *P. superbiens*, dan *P. limeanum*.

Anggrek kasut *P. supardii* merupakan salah satu anggrek endemik Kalimantan yang menarik sebagai tanaman hias, sehingga sangat penting untuk dikonservasi. *P. supardii* dikategorikan sebagai spesies prioritas untuk konservasi di Indonesia (Risna et al., 2010). Bentuk bunga yang unik dan rangkaian bunganya dalam satu tandan dapat mencapai enam

kuntum merupakan kelebihan anggrek ini (Gambar 1). Habitat hidupnya menempel pada batu-batu yang ditumbuhi lumut (Banks, 2004).

Upaya yang telah dilakukan oleh Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Raya Bogor untuk mengkonservasi anggrek-anggrek langka selain dengan perbanyakan secara *in vitro* juga dengan metode penyimpanan biji. Penyimpanan biji anggrek pada suhu kamar sangat tidak disarankan karena viabilitas biji dapat menurun dengan cepat (dalam kurun waktu 6 bulan) (Handini dan Puspitaningtyas, 2009). Penyimpanan biji dengan mengurangi kadar air hingga 13% sebelum disimpan dalam *freezer* (-20 °C) dapat memperpanjang masa simpan biji. Biji Anggrek *Dendrobium stratiotes* yang disimpan dalam *freezer* -20°C mampu bertahan hingga 12 bulan (Puspitaningtyas dan Handini, 2011). Teknologi yang secara umum sudah banyak digunakan di bank biji adalah penyimpanan biji anggrek dengan menurunkan kadar airnya hingga 5% dan disimpan pada suhu beku -20°C (Seaton et al., 2013). Kadar air yang rendah dapat mengurangi kerusakan pada biji karena kontaminasi jamur atau bakteri dan suhu rendah mampu menghambat perkembangan mikrobia

Uji viabilitas biji anggrek yang disimpan dilakukan dengan metode langsung yaitu dengan mengecambahkan biji-biji anggrek pada media buatan dan menghitung jumlah biji-biji yang berkecambah maupun yang tidak berkecambah (Puspitaningtyas dan Handini, 2014). Keberhasilan perkecambahan biji anggrek tergantung terutama pada viabilitasnya dan media yang digunakan untuk



**Gambar 1.** Bunga *Paphiopedilum supardii*

perkecambahan. Media kultur seperti Knudson C (KC), Vacin and Went (VW) atau modifikasinya telah banyak digunakan untuk perkecambahan maupun pembesaran pertumbuhan semai biji anggrek (Arditti, 1967). Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Raya Bogor mencoba menggunakan empat jenis media (Knudson C ditambah unsur mikro, modifikasi Knudson C, pupuk daun 25:5:20, Vacin and Went dengan penambahan bahan organik untuk perkecambahan anggrek *Paphiopedilum*. Keempat media semai tersebut secara rutin sudah digunakan dalam penyemaian biji-biji anggrek di Kebun Raya (Puspitaningtyas dan Handini, 2014; Puspitaningtyas dan Handini, 2011; Handini dan Puspitaningtyas, 2009; Handini dan Mursidawati, 2008). Namun, masing-masing spesies anggrek mempunyai kesesuaian media tumbuh yang berbeda-beda.

Banyak jenis anggrek yang bijinya mudah dikecambahkan pada sejumlah jenis media kultur (Withner, 1959; Arditti, 1979), tetapi ada beberapa marga anggrek yang tergolong sulit berkecambah (Stimart dan Ascher, 1981), seperti *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* dan *Selenipedium* (Arditti dan Harrison, 1977). Banyak penelitian tentang media yang dilakukan khusus untuk perkecambahan marga anggrek tersebut (Thompson, 1974; Flamee, 1978; Ernst, 1980; Thomale, 1954).

Anggrek *Paphiopedilum* memiliki masalah perkecambahan dengan tingkat kesulitan yang tinggi dibanding jenis anggrek lainnya seperti *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, dan *Vanda* karena adanya hambatan impermeabilitas pada kulit bijinya (Arditti, 1967). Hal ini disebabkan karena dinding testa (kulit biji)

*Paphiopedilum* lebih tebal dan bersifat impermeabel (Has-von Schmude *et al.*, 1986). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penyimpanan biji anggrek pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  terhadap daya tumbuhnya dan multiplikasi tunas pada beberapa komposisi media.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya-LIPI, di Bogor. Penyimpanan biji dilakukan pada bulan November 2009 sampai dengan Maret 2011. Penelitian lanjutan untuk pembesaran eksplan *protocorm P. supardii* dilakukan pada bulan Mei 2012 sampai dengan Oktober 2013. Bahan tanaman yang digunakan adalah biji anggrek *P. supardii* yang berasal dari satu buah yang telah masak fisiologis. Biji diambil dari satu buah yang memiliki warna kulit buah yang menghitam, dan bila dipencet tekstur buah agak lunak atau dari buah yang merekah rusuk buahnya. Satu buah diperkirakan mengandung sekitar 12.000–24.000 biji berembrio maupun biji hampa ( belum ada pustaka yang menyatakan secara pasti jumlah biji dari satu buah anggrek jenis ini ).

Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Lengkap satu faktor, yaitu perlakuan media perkecambahan. Empat komposisi media yang diuji adalah:

- KC yaitu media dasar Knudson C dengan penambahan bahan organik (air kelapa  $150\text{ ml L}^{-1}$ )

dan ekstrak taoge 150 g L<sup>-1</sup>), gula 20 g L<sup>-1</sup> dan arang aktif 1 g L<sup>-1</sup>

- KCA putih yaitu media dasar Knudson C murni dengan penambahan gula 20 g L<sup>-1</sup>, dan unsur mikro (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,8 mg L<sup>-1</sup>, MoO<sub>3</sub> 3,12 mg L<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub> 0,8 mg L<sup>-1</sup>, dan CuSO<sub>4</sub> 16,55 mg L<sup>-1</sup>).
- HS (Pupuk daun 25:5:20 dengan penambahan gula 15 g L<sup>-1</sup>, pepton 2 g L<sup>-1</sup>, ekstrak kentang 40 g L<sup>-1</sup>, dan arang aktif 1 g L<sup>-1</sup>).

VW yaitu Vacin and Went dengan penambahan bahan organik (air kelapa 150 ml L<sup>-1</sup>, ekstrak taoge 100 g L<sup>-1</sup>, ekstrak tomat 100 g L<sup>-1</sup>), gula 20 g L<sup>-1</sup>, arang aktif 1 g L<sup>-1</sup> dan NAA 10 ppm.

Pengujian viabilitas biji dilakukan pada biji yang telah disimpan dalam freezer dengan suhu -20 °C bulan ke 0, 1, 2, 3, 6, 9, dan 12 setelah penyimpanan. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah kecambah hijau, kecambah coklat dan biji yang tidak berkecambah (mati). Setiap media perlakuan diulang tiga kali dengan tiga petri per ulangan dan >100 benih per petri. Data dianalisis dengan menggunakan ANOVA, bila terdapat beda nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD (Beda Nyata Jujur).

### Metode Penyimpanan

Biji dikeluarkan dari dalam buah, disaring dengan saringan teh dan dimasukkan dalam cawan petri, kemudian diletakkan dalam desikator yang berisi silica gel selama 5 hari untuk mengurangi kadar air. Selanjutnya biji yang berasal dari satu buah tersebut dimasukkan dalam satu botol yang tertutup rapat dan dimasukkan dalam freezer dengan suhu -20 °C.

### Uji Perkecambahan/viabilitas biji angrek

Uji perkecambahan dilakukan pada biji yang disimpan 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12 bulan. Sterilisasi biji dilakukan sebelum biji disemai untuk uji viabilitas. Sampel biji dimasukkan dalam botol yang berisi aquadest steril dan ditambah 3 tetes tween, kemudian divakum selama 1 jam (sampai biji tenggelam). Setelah itu, kegiatan dilakukan di dalam laminar air flow. Biji dicuci dengan larutan clorox 10% selama 10 menit, kemudian biji dicuci lagi dengan larutan clorox 5% selama 5 menit. Biji kemudian

dibilas dengan aquadest steril tiga kali. Setelah itu, biji didistribusikan dalam media semai (KC, KCA, HS dan VW).

Penghitungan kecambah biji dilakukan pada jumlah biji yang berkecambah menjadi *protocorm*, yaitu embrio biji yang mengalami pembengkakan (*swollen*) setelah proses imbibisi air hingga merobek testa biji (Seaton dan Ramsay, 2005).

### Metode Multiplikasi

Tahap selanjutnya setelah biji berkecambah adalah multiplikasi *protocorm* atau tunas yang dilakukan dengan cara subkultur atau pindah tanam. Media transplanting adalah salah satu dari empat media semai (KC, KCA, HS dan VW) yang memberikan hasil terbaik, diharapkan media ini juga sesuai untuk mendukung terjadinya multiplikasi tunas dan merangsang percepatan pertumbuhan daun serta akar. Berdasarkan hasil uji semai sebelumnya media terbaik untuk perkecambahan *P. supardii* adalah media dasar Knudson C. Media ini dimodifikasi untuk mendukung pertumbuhan eksplan selanjutnya dengan variasi sebagai berikut:

- a. KC yaitu Knudson C dengan penambahan arang aktif 1 g L<sup>-1</sup> dan bahan organik (air kelapa 150 ml L<sup>-1</sup>, ekstrak taoge 150 g L<sup>-1</sup>).
- b. KCA hitam yaitu Knudson C dengan penambahan arang aktif 1 g L<sup>-1</sup>; bahan organik (air kelapa 150 ml L<sup>-1</sup>, ekstrak taoge 150 g L<sup>-1</sup>); dan unsur mikro (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,8 mg L<sup>-1</sup>, MoO<sub>3</sub> 3,12 mg L<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub> 0,8 mg L<sup>-1</sup>, dan CuSO<sub>4</sub> 16,55 mg L<sup>-1</sup>). Media ini merupakan modifikasi Knudson C dengan menggabungkan penambahan bahan organik dan unsur mikro.
- c. KCA putih yaitu Knudson C dengan penambahan unsur mikro (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,8 mg L<sup>-1</sup>, MoO<sub>3</sub> 3,12 mg L<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub> 0,8 mg L<sup>-1</sup>, dan CuSO<sub>4</sub> 16,55 mg L<sup>-1</sup>).

### Metode Pembesaran *Protocorm*

Tujuan pengamatan dari fase ini adalah untuk mendapatkan media yang dapat menghasilkan bibit yang memiliki ukuran daun dan akarnya besar. Media yang dipakai adalah media transplanting tersebut di atas yang terseleksi dan sudah dicoba sebelumnya, yang dapat menginduksi pertumbuhan tunas dan dapat mempercepat pertumbuhan daun dan akar.

Data dianalisis dengan menggunakan ANOVA, bila terdapat beda nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.

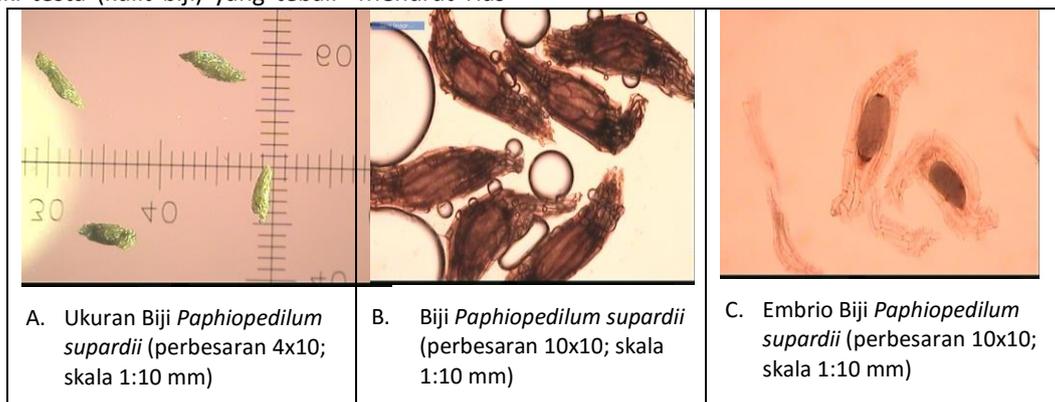
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik morfologi dan sifat simpan biji *Paphiopedilum supardii*

Bentuk biji anggrek marga *P. supardii* umumnya bulat lonjong dengan kedua ujung menyempit. Ukuran biji *P. supardii* panjangnya 0,5-1 mm dan lebar  $\pm 0,2$  mm (Gambar 2-A). Embrio terletak pada bagian tengah biji. Hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa biji *P. supardii* tidak memiliki endosperm yang berfungsi sebagai tempat cadangan makanan yang diperlukan dalam proses perkecambahan biji (Gambar 2). Biji *P. supardii* memiliki testa (kulit biji) yang tebal. Menurut Has-

von Schmude *et al.* (1986) testa biji *Paphiopedilum* mempunyai lapisan kedap air yang dapat menurunkan permeabilitasnya dan menghambat perkecambahan. Upaya peningkatan permeabilitas testa dan merangsang perkecambahan biji anggrek dapat dilakukan dengan cara merendam biji dalam larutan sodium atau calcium hypochlorite selama 5-10 menit, sehingga embrio akan tampak jelas di tengah-tengah bijinya (Gambar 2-C).

Biji *P. supardii* memerlukan substrat yang dapat menginduksi proses perkecambahan dan mendukung pertumbuhannya untuk menjadi individu baru, sehingga diperlukan media perkecambahan dengan komposisi tertentu untuk mendukung proses tersebut. Berdasarkan hasil pengamatan biji anggrek *P. supardii* berkecambah 2,5-3 bulan setelah semai.



Gambar 2. Biji Anggrek *Paphiopedilum supardii*

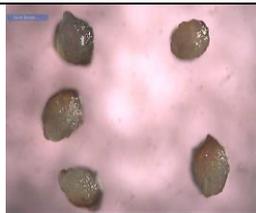
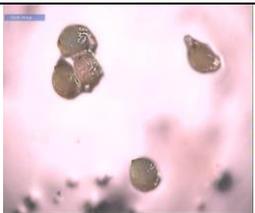
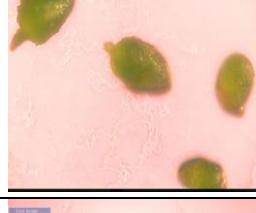
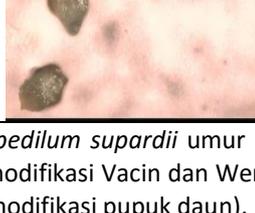
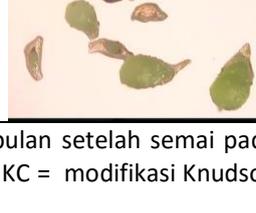
### Uji perkecambahan *Paphiopedilum supardii*

#### Fase semai

Hasil uji viabilitas biji *P. supardii* pada 0, 1, 2, 3, 6, 9 dan 12 bulan setelah penyimpanan menunjukkan perbedaan daya tumbuh (vigor) dari biji yang ditumbuhkan pada keempat media. Media Knudson C murni ditambah unsur mikro (KCA) menghasilkan penampilan *protocorm* paling baik dilihat dari keragaan bentuk *protocorm* yang tumbuh normal dan berwarna hijau. Media pupuk daun (HS), Vacin & Went (VW) maupun Knudson C dengan penambahan bahan organik tanpa unsur mikro (KC) memberikan hasil persentase *protocorm* yang tinggi tetapi warna dari *protocorm* yang tumbuh banyak

yang berwarna coklat atau coklat kehijauan dan tidak dapat tumbuh normal (Gambar 3; Tabel 1). *Protocorm* hijau akan menghasilkan planlet yang tumbuh besar sempurna lengkap dengan tunas dan akar, sedangkan *protocorm* coklat tidak dapat tumbuh sempurna, daun dan akar tidak terbentuk dan akhirnya mati. Hal ini menunjukkan bahwa unsur mikro sangat dibutuhkan dalam perkecambahan biji anggrek *P. supardii*.

Ukuran *Protocorm* yang tumbuh semakin mengecil seiring dengan semakin lamanya penyimpanan biji karena viabilitas biji yang makin rendah, sehingga pertumbuhan kecambah juga makin lambat.

Umur simpan biji	MEDIA PERKECAMBAHAN BIJI <i>Paphiopedilum supardii</i>			
	VW	HS	KC	KCA
0 Bulan (biji segar)				
1 Bulan				
2 Bulan				
3 Bulan				
6 Bulan				
9 Bulan				
12 Bulan				

**Gambar 3.** Protocorm hasil perkecambahan biji angrek *Paphiopedilum supardii* umur 3 bulan setelah semai pada empat media dan waktu simpan yang berbeda (VW=modifikasi Vacin dan Went, KC = modifikasi Knudson C, KCA= Knudson C murni ditambah unsur mikro, HS=modifikasi pupuk daun).

**Tabel 1.** Persentase perkecambahan biji *Paphiopedilum supardii* yang ditumbuhkan pada empat macam media dengan waktu simpan yang berbeda

Media	Waktu Simpan Biji (bulan)						
	0	1	2	3	6	9	12
Persentase Kecambah ( <i>protocorm</i> ) Hijau (%)							
VW	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
KC	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
KCA	77,7 a	50,5 a	48,3 a	48,2 a	46,7 a	29,3 a	26,7 a
HS	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
Persentase Kecambah ( <i>protocorm</i> ) coklat (%)							
VW	88,8 a	89,7 a	78,9 b	88,4 a	89,4 a	79,5 b	73,5 b
KC	86,4 a	87,7 ab	81,9 ab	88,0 a	88,5 a	89,6 a	75,3 b
KCA	1,3 b	0,0 c	0,8 c	0,0 b	0,0 b	4,1 c	0,0 c
HS	91,2 a	82,2 b	85,6 a	90,1 a	94,3 a	91,6ab	83,7 a
Persentase Biji tidak berkecambah (%)							
VW	11,2	10,3	21,1	11,6	10,5	20,5	26,5
KC	13,6	12,3	18,1	12,0	11,5	10,4	24,7
KCA	21,0	49,5	51,0	51,8	53,3	66,6	73,2
HS	8,7	17,8	14,4	9,8	5,7	8,4	16,3

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak menunjukkan beda nyata pada taraf 5% ( $P < 0,05$ ) dalam uji Tukey HSD. VW=modifikasi Vacin dan Went, KC = modifikasi Knudson C, KCA= Knudson C murni ditambah unsur mikro, HS=modifikasi pupuk daun.

Jumlah kecambah hijau maupun kecambah coklat pada media KCA berbeda nyata dengan ketiga media lainnya pada semua hasil uji (Tabel 1). Persentase kecambah hijau 77,74% dan menurun secara gradual dengan bertambahnya umur simpan biji hingga 12 bulan menjadi 26,75%.

Media KCA mengandung unsur mikro antara lain Cuprum (Cu), Seng (Zn), unsur besi (Fe), Boron (B) dan Molibdenum (Mo). Unsur-unsur mikro ini berperan penting dalam pertumbuhan dan pembentukan klorofil yang memberi warna hijau pada *protocorm*. Menurut Marschner (1995), Cu dan Zn berperan dalam pengaturan sistem enzim tanaman dan Fe berperan dalam pembentukan klorofil, B berperan sebagai kofaktor dalam sintesis klorofil, terlibat dalam transport karbohidrat dan sintesis asam nukleat, sedangkan Mo esensial untuk fiksasi nitrogen serta kofaktor dalam reduksi nitrat (Marschner, 1995).

Persentase biji tidak berkecambah pada media KCA makin meningkat dengan semakin lamanya masa

penyimpanan biji (Tabel 1), karena biji semakin tidak viable. *Protocorm P. supardii* pada media KCA dapat tumbuh menjadi planlet yang sempurna. Media pupuk daun dan Vacin & Went tidak sesuai untuk perkecambahan biji anggrek *P. supardii* yang ditunjukkan dengan *protocorm* yang berwarna coklat dan terhentinya perkembangan *protocorm* menjadi planlet yang sempurna karena tanpa penambahan unsur mikro, (Handini dan Mursidawati, 2008).

#### Fase Multiplikasi Tunas

Setelah 2 bulan induksi dan hasil subkultur *protocorm* pada media Knudson C yang telah dimodifikasi menunjukkan rerata jumlah tunas per botol pada media KCA hitam adalah 28,44 tunas, media KC 24,86 tunas dan pada media KCA putih 0,5 tunas (Gambar 4). Media KCA putih menumbuhkan tunas paling sedikit dengan kondisi tunas yang tidak baik, pertumbuhan yang lambat dan daunnya makin lama makin mencoklat kemudian tunas mati (Gambar 4-B). Media KCA putih (tanpa bahan organik air kelapa dan ekstrak taoge) yang memberikan hasil paling baik untuk perkecambahan biji *P. supardii*

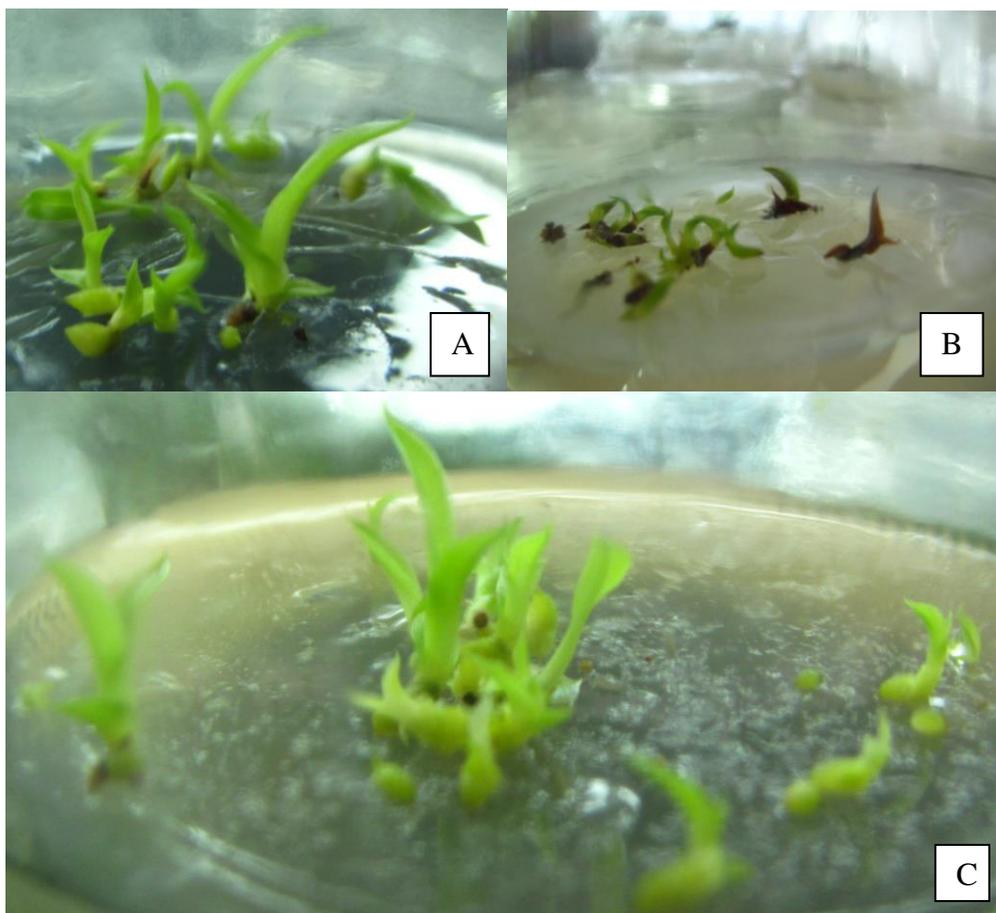
tetapi ternyata tidak cocok sebagai media pembesaran untuk pertumbuhan lanjut *protocorm* anggrek *P. supardii*. Sementara itu, media KC dan KCA hitam menghasilkan tunas relatif banyak, sehingga dapat dipakai untuk bahan perbandingan. Penambahan bahan organik dibutuhkan dalam multiplikasi dan pembentukan warna daun planlet.

Kebanyakan media anggrek menggunakan gula sebagai sumber karbon (C). Gula yang digunakan dalam kultur jaringan anggrek berbeda-beda tingkatnya tetapi secara umum 2 – 5%. Zeatin dan zeatin ribose terkandung dalam air kelapa. Kedua hormon ini termasuk dalam golongan sitokinin yang berguna untuk menginduksi tunas (Arditti dan Ernst, 1993).

#### Fase Pembesaran Tunas

Eksplan yang berupa tunas ditumbuhkan pada media KCA putih (Knudson C dengan penambahan unsur mikro) banyak yang mati karena komposisi media tidak mendukung pertumbuhan eksplan. Hal ini menyebabkan data pada media KCA tidak dapat dianalisis. Eksplan yang tidak tumbuh tanpa BO membuktikan bahwa penambahan bahan organik sangat dibutuhkan pada tahap pembesaran eksplan tunas *P. supardii*.

Hasil pengamatan (Gambar 5) menunjukkan bahwa pada fase pembesaran tunas, media dasar Knudson C dengan penambahan bahan organik yaitu



**Gambar 4.** Pertumbuhan *protocorm* anggrek *Paphiopedilum supardii* pada media Knudson C yang dimodifikasi pada 2 bulan setelah kultur, (A) media KC, (B) media KCA putih, dan (C) KCA hitam. Planlet berasal dari biji yang telah disimpan selama 12 bulan

air kelapa ( $150 \text{ ml L}^{-1}$ ) dan ekstrak taoge ( $150 \text{ g L}^{-1}$ ), merupakan kombinasi yang terbaik untuk tahap multiplikasi dan pengakaran. Semua parameter yang diamati pada planlet yang tumbuh di media KC lebih tinggi dibandingkan planlet yang tumbuh di media KCA hitam. Namun hanya jumlah akar dari planlet

anggrek *P. supardii* yang ditumbuhkan pada media KC dan KCA hitam yang berbeda nyata, sedangkan parameter jumlah daun dan panjang tunas pada kedua macam media tersebut tidak menunjukkan beda nyata (Tabel 2).

**Tabel 2.** Pertambahan jumlah daun, panjang tunas, dan jumlah akar kultur anggrek *Pahiopedilum supardii* setelah 8 bulan subkultur pada dua macam media.

Media	Parameter yang diamati		
	Jumlah daun	Panjang tunas	Jumlah akar
KC	10,90 a	0,95 a	13,75 a
KCA hitam	9,35 a	0,55 a	11,05 b

Keterangan = Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak menunjukkan beda nyata pada taraf 5% ( $P < 0,05$ ) dalam uji Tukey (HSD). KC= modifikasi Knudson C+ arang aktif+air kelapa + ekstrak taoge; KCA hitam= modifikasi Knudson C+arang aktif+air kelapa+ ekstrak taoge+ unsur mikro.

Air kelapa dan ekstrak taoge merupakan senyawa organik yang sering digunakan dalam aplikasi teknik kultur jaringan. Hal ini disebabkan air kelapa mengandung zat/bahan-bahan seperti unsur hara, vitamin, asam amino, asam nukleat dan zat tumbuh seperti auksin dan asam giberelat yang berfungsi sebagai penstimulir proliferasi jaringan, memperlancar metabolisme dan respirasi Tulecke *et al.*, (1961). Kandungan fitohormon auksin antara lain dalam bentuk indole-3-acetic acid, sedangkan sitokinin antara lain dalam bentuk zeatin, kinetin, zeatin ribosida, dan lain-lain (Yong *et al.*, 2009; Staden dan Drews, 1974) dengan komposisi ZPT Kinetin (sitokinin)  $41,13 \text{ mg L}^{-1}$ , Zeatin (sitokinin)  $34,16 \text{ mg L}^{-1}$  dan IAA (auksin)  $38,57 \text{ mg L}^{-1}$  (Kristina dan Syahid, 2012).

Bahan organik dan hara diperlukan untuk pembesaran planlet. Secara umum media kultur jaringan tanaman mengandung beberapa atau semua komponen berikut: unsur makro, unsur mikro, vitamin, asam amino atau suplemen nitrogen (N), sumber karbon (C), bahan organik, ZPT dan zat pematid (agar-agar). Konsentrasi masing-masing nutrisi perlu dipertimbangkan untuk memaksimalkan rerata pertumbuhan tanaman berbeda tiap jenisnya (Saad dan Elshahed, 2012). Zat pengatur tumbuh mempunyai peran yang penting dalam menentukan jalur perkembangan sel dan

jaringan tanaman pada media kultur. Jenis dan konsentrasi ZPT tergantung jenis tanaman, jaringan atau organ yang dikultur dan tujuan dari penelitian. Konsentrasi tinggi untuk auksin biasanya untuk merangsang pertumbuhan akar, sedangkan konsentrasi sitokinin yang tinggi mendukung pembentukan tunas. Jika diberi perlakuan yang seimbang antara auksin dan sitokinin maka akan membentuk massa sel yang tidak terdiferensiasi yang disebut kalus (Semiarti *et al.*, 2014)

## KESIMPULAN

Biji anggrek *P. supardii* dapat disimpan hingga 12 bulan pada suhu  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , namun viabilitas biji menurun menjadi 26,75% setelah 12 bulan penyimpanan. Media Semai yang terbaik untuk perkecambahan biji anggrek *P. supardii* adalah KCA putih (Knudson C dengan penambahan unsur mikro). Media terbaik untuk multiplikasi eksplan protokorm adalah, media Knudson C + arang aktif+air kelapa+ ekstrak taoge+ unsur mikro(KCA hitam), sedangkan media terbaik pada fase pertumbuhan adalah, media Knudson C + arang aktif+air kelapa + ekstrak taoge (KC).

Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk melihat daya simpan biji anggrek *P. supardii* sampai biji yang disimpan tidak mampu berkecambah. Uji perkecambahan juga perlu dilakukan dengan media semai Knudson C

dengan berbagai perlakuan bahan organik, unsur mikro atau perlakuan cahaya terhadap perkecambahannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review* 33:1–97.
- Arditti, J. 1979. Aspects of the physiology of orchid. *Advances in Botanical Research* 7: 421–655.
- Arditti, J. and C.R. Harrison. 1977. *Vitamin requirements and metabolism in orchids*. In: Orchid Biology. (J. Arditti, ed.). Corneal University Press. New York. Pp. 159–175.
- Arditti, J, and Robert Ernst. 1993. *Micropropagation of Orchids*. A Willey-Interscience publication. Canada. Pp. 612–614.
- Banks, D.J., 2004. *Handy Pocket Guide to The Orchids of Indonesia*. Periplus Editions (HK). Ltd. Singapore. pp. 42–48.
- Ernst, R. 1980. Seed germination of *Paphiopedilum*. *The Orchid Review*, 88:235–236.
- Flamee, M. 1978. Influence of selected media and supplements on the germination and growth of *Paphiopedilum* seedlings. *American Orchid Society Bulletin*, 47:419–423.
- Handini, E. dan D.M. Puspitaningtyas. 2009. Studi penyimpanan biji anggrek *Cymbidium finlaysonianum*. In: Kurniawan, A., N.K.E. Undaharta, I.P.A.H. Wibawa, I.G. Tirta, W. Sujarwo (Eds.). *Prosiding Konservasi Flora Indonesia dalam Mengatasi Dampak Pemanasan Global*, UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya 'Eka Karya' Bali – LIPI. Hal: 183–190
- Handini, E. dan S. Mursidawati., 2008. Perbanyak Anggrek Kantong (*Paphiopedilum* spp.) di Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Raya Bogor. *Warta Kebun Raya* 8(2):89–92.
- Has-von Schmude, N.F., E. Lucke, R. Ernst and J. Arditti. 1986. *Paphiopedilum rothschildianum*. *American Orchid Society Bulletin*, 55:579–584.
- Kristina, N.N. dan S.F. Syahid. 2012. Pengaruh Air Kelapa Terhadap Multiplikasi Tunas *In Vitro*, Produksi Rimpang, dan Kandungan Xanthorrhizol Temulawak di Lapangan. *Jurnal Litri* 18(3):125–134.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Second edition. Functions of Mineral Nutrients: Micronutrients. Academic Press Limited, Harcourt Brace & Company, Publishers. London. pp: 313–404.
- Puspitaningtyas, D.M. dan E. Handini. 2011. Uji Daya Simpan Biji Anggrek *Dendrobium stratiotes* Rchb.f. In: Widyatmoko, D., D.M. Puspitaningtyas, R. Hendrian, Irawati, I. A. Fijridiyanto, J.R. Witono, R.A. Risna, S.R. Ariati, S. Rahayu, T. Ng. Praptosuwiryo (eds.). *Prosiding Seminar Nasional Konservasi Tumbuhan Tropika: Kondisi Terkini dan Tantangan ke Depan*. Hal: 60–65.
- Puspitaningtyas, D.M. dan E. Handini. 2014. Penyimpanan Biji Anggrek *Coelogyne* spp. untuk Konservasi *Ex Situ*. *Buletin Kebun Raya*, 17(2):101–111.
- Rankou, H. and R. O'Sullivan. 2015. *Paphiopedilum supardii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. <http://www.iucnredlist.org/details/43322279/0>. Diunduh 13 Juni 2016.
- Risna, R.A., Y.W.C. Kusuma, D. Widyatmoko, R. Hendrian, dan D.O. Pribadi. 2010. *Species Prioritas untuk Konservasi Tumbuhan Indonesia. Seri I. Areaceae, Cyatheaceae, Nepenthaceae, Orchidaceae*. Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor – LIPI. Bogor.
- Saad AIM dan AM Elshahed, 2012. Plant Tissue Culture Media. Intech open science. Doi: 10.5772/50569
- Seaton, P.T., J.P. Kendon, H.W. Pritchard, D.M. Puspitaningtyas, and T.R. Marks. 2013. Orchid Conservation: the next ten years. *Lankesteriana* 13(1-2): 93–101.
- Seaton, P. and M. Ramsay. 2005. Growing Orchids from Seed. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Semiarti E, A Purwantoro, dan A. Indrianto. 2014. *In vitro* Culture of Orchids: The Roles of Class-1 KNOXX Gene in Shoot Development. A Review. *Journal of Biological Researches* 20: 18–27.
- Stimart, D.P. and P.D. Ascher. 1981. *In Vitro* germination of *Paphiopedilum* seed or a completely defined medium. *Scientia Horticulturae* 14:165–170.

- Thomale, H. 1954. *Die orchideen*. Eugen Ulmer Verlag. Stuttgart.
- Thompson, P.A. 1974. Orchids from seed: A new basal medium. *The Orchid Review* 82: 179–183.
- Tulecke, W., L. H. Weinstein, A. Rutner and H. J. Laurencot. 1961. *The Biochemical Composition of Coconut Water (Coconut Milk) as Related to its use in Plant Tissue Culture*. Plant Res.Inc. Yonkers 3. New York.
- Withner, C.L. 1959. *Orchid Physiology*. In: Withner, C.L. (ed). *The orchids: a scientific survey*. Ronald Press, New York.
- Yong J. W. H., Liya Ge, Yan Fei Ng and Swee Ngim Tan. 2009. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules* 14(12): 5144–5164. Doi: 10.3390/molecules14125144. Diakses tanggal 15 Juni 2016.

