

Karakter Morfo-Fisiologi Daun Tiga Jenis Plantlet Anggrek pada Tahapan Aklimatisasi (Leaf Morpho-Physiological Characters of Three Orchid Species on an Acclimatization Stage)

Arief Priyadi dan Ema Hendriyani
BKT Kebun Raya Eka Karya Bali – LIPI
Candikuning, Baturiti, Tabanan, Bali, Indonesia 82191
E-mail: arief.priyadi@lipi.go.id

Diterima: 2 Januari 2016 ; direvisi: 17 Oktober 2016 ; disetujui: 2 November 2016

ABSTRAK. Teknik perbanyakan secara *in vitro* memerlukan kondisi lingkungan yang terkendali untuk mengoptimalkan pertumbuhan plantlet. Namun, saat plantlet dipindahkan pada fase *ex vitro* dengan kondisi lingkungan tidak terkendali sering terjadi kematian plantlet. Oleh karena itu aklimatisasi merupakan tahap penting pada transplantasi plantlet dari fase *in vitro* ke fase *ex vitro*. Selama 10 tahun ini Kebun Raya Eka Karya Bali (KREKB) bersama tiga Kebun Raya Indonesia (KR Bogor, KR Cibodas, dan KR Purwodadi) aktif berperan dalam upaya konservasi anggrek alam secara *in vitro*. *Bulbophyllum echinolabium*, *Dendrobium fimbriatum*, dan *D. spectabile* merupakan jenis anggrek alam yang telah berhasil diperbanyak secara *in vitro* di KREKB. Walaupun upaya perbanyakan ini telah lama dilakukan, tetapi tahapan aklimatisasi baru dilaksanakan pada tahun 2012. Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi tahapan aklimatisasi plantlet dari tiga jenis anggrek alam hasil kultur *in vitro* di KREKB. Perlakuan pertama tahapan aklimatisasi adalah pemberian sungkup dengan tujuan mengurangi fluktuasi kelembaban udara. Sungkup perlahan-lahan dibuka secara bertahap selama 1 bulan agar plantlet dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan terbuka. Perlakuan kedua adalah penyiraman 2–3 kali/minggu dan pemberian pupuk daun sebanyak 1 kali/minggu. Tahapan ini dilakukan selama 14–16 bulan sejak penanaman. Persentase plantlet yang hidup dihitung secara periodik. Pada akhir tahapan aklimatisasi, dilakukan pengamatan karakter stomata dari ketiga jenis anggrek tersebut meliputi ukuran, densitas, dan pola buka-tutupnya selama 24 jam periode pengamatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 25–45% plantlet dapat bertahan hidup hingga akhir penelitian. Ukuran stomata pada tiap spesies bervariasi, stomata terbesar dimiliki oleh *B. echinolabium*. Densitas stomata antara daun tua dan muda tidak menunjukkan pola yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa karakter densitas stomata lebih dipengaruhi oleh spesies spesifik, sedangkan pengamatan terhadap pola buka tutup stomata pada *D. fimbriatum* dan *D. spectabile* menunjukkan bahwa kedua jenis anggrek tersebut memiliki tipe fotosintesis CAM, sedangkan pada *B. echinolabium* merupakan anggrek dengan tipe fotosintesis C3. Informasi ini tidak hanya penting untuk menentukan perlakuan yang tepat selama tahapan aklimatisasi tetapi juga untuk keefektifan aplikasi penyiraman dan pemupukan sehingga mendukung keberhasilan budidaya.

Kata kunci: Aklimatisasi anggrek; Stomata; C3; CAM

ABSTRACT. *In vitro* plant propagation technique requires strict controls of its environmental conditions in order to optimize growth of plantlets. However, when the plantlets are moved to uncontrolled condition, the plantlets are often collapse. In this regards, acclimatization practices play important roles to provide transitional conditions from fully *in vitro* fully *ex vitro*. During the last 10 years, Bali Botanic Garden (BBG) has been actively involved in the *in vitro* propagation of species orchids, along with three other Botanic Gardens in Indonesia (Bogor, Cibodas, and Purwodadi). *Bulbophyllum echinolabium*, *Dendrobium fimbriatum*, and *D. spectabile* have been among the first succeeded *in vitro* propagated species orchids by BBG. Despite of long periods of orchid *in vitro* propagation efforts, acclimatization practices was not started until 2012. This experiment was carried out to evaluate the acclimatization step of *in vitro* propagated native species orchid in BBG. Plantlets of three species of orchids were planted *ex vitro*. First of all, plastic sheet cover was applied to minimize air relative humidity fluctuation. After a month, the sheet was gradually opened until the plantlets were able to survive without cover. The second practices were water spraying 2–3 times a week and foliar fertilization each week. These were conducted in a period of 14 – 16 months since the planting date. Percentage of survived plantlets were recorded time after time. By the end of the acclimatization period, a series of stomatal observations were performed to assess its size, density, and opening-closing rhythm in a 24 hours period. The results showed that 25% to 45% of plantlets succeeded to survive. Stomatal size varied across species, in which the largest is *B. echinolabium*'s and stomatal size of *D. fimbriatum* and *D. spectabile* were comparable each other. There was no general pattern of stomatal density between mature and young leaves because this trait seemed to be species specific. Diurnal stomatal opening-closing rhythm suggested that *D. fimbriatum* and *D. spectabile* are orchids with CAM photosynthetic pathway whereas the pathway of *B. echinolabium* is C3. Information on these characters was not only important to formulate best practices in acclimatization efforts but also further cultural practices such as watering and foliar fertilizer applications.

Keywords: Acclimatization; Stomata; C3; CAM

Anggrek merupakan salah satu tanaman yang memiliki peran penting dalam industri hortikultura sebagai tanaman hias maupun bunga potong. Kebun Raya Eka Karya Bali-LIPI (KREKB-LIPI) merupakan salah satu lembaga konservasi, telah melakukan upaya

perbanyakan spesies anggrek alam dengan teknik konvensional maupun *in vitro*. Selain untuk tujuan konservasi, upaya perbanyakan ini dimaksudkan untuk dapat mendukung perkembangan industri hortikultura di Indonesia. Program perbanyakan anggrek alam

secara *in vitro* di KREKB-LIPI telah diinisiasi sejak tahun 2007. Jenis anggrek yang telah diperbanyak antara lain: *Bulbophyllum echinolabium* J.J.Sm., *Dendrobium fimbriatum* Hook, *D. macrophyllum* A.Rich, *D. spectabile* (Blume) Miq., dan *Paphiopedilum javanicum* (Reinw. ex Lindl.) Pfitzer melalui kultur biji (Isnaini *et al.* 2011). Dari kelima jenis tersebut, tiga jenis telah siap untuk diaklimatisasi, yaitu *B. echinolabium*, *D. fimbriatum*, dan *D. spectabile*.

Kultur *in vitro* telah dimanfaatkan untuk perbanyak massal pada berbagai jenis anggrek untuk tujuan konservasi maupun komersil. Faktor lingkungan dalam kultur *in vitro* dikontrol sedemikian rupa sehingga ideal bagi pertumbuhan plantlet. Hal sebaliknya terjadi ketika plantlet ditanam di lingkungan *ex vitro*. Pada umumnya lingkungan *ex vitro* dicirikan dengan kelembaban nisbi udara lebih rendah dan intensitas cahaya lebih tinggi dibanding kondisi *in vitro*, yang pada akhirnya sering menyebabkan kegagalan pertumbuhan plantlet (Hazarika 2003b). Beberapa abnormalitas morfo-fisiologis plantlet seperti efisiensi fotosintetik rendah, malfungsi stomata, dan berkurangnya lapisan *epicuticular wax* pada daun merupakan alasan yang dapat menjelaskan ketidakberhasilan pertumbuhan plantlet pada kondisi lingkungan *ex vitro* (Hazarika 2006).

Fotosintesis merupakan proses konversi CO₂ menjadi senyawa organik, pada tumbuhan terestrial terjadi dalam tiga lintasan, yaitu C3, C4, dan CAM (*crassulacean acid metabolism*), dari ketiganya C3 dianggap paling primitif (West-Eberhard *et al.* 2011) dan CAM paling mutakhir (Zhang *et al.* 2016). Jenis anggrek (famili Orchidaceae) diketahui mempunyai tipe fotosintesis C3 atau CAM (Hew & Yong 2004). Secara morfologis jenis anggrek yang memiliki daun tipis mempunyai tipe fotosintesis C3, sedangkan jenis anggrek dengan daun tebal berdaging bertipe CAM (Goh *et al.* 1977, Hew & Khoo 1980, He *et al.* 1998, Hew & Yong 2004). Fiksasi CO₂ pada tanaman C3 terjadi saat ada cahaya, sedangkan pada CAM terjadi saat kondisi gelap (Hew & Yong 2004). Oleh karena itu, pada kondisi normal stomata tanaman C3 membuka pada siang hari dan menutup pada malam hari, sedangkan ritme sebaliknya terjadi pada CAM (Goh *et al.* 1977, Hew & Yong 2004). Tipe fotosintesis CAM sesuai dengan gaya hidup anggrek epifit dengan lingkungan tumbuh alami yang umumnya mengalami cekaman kekeringan, yaitu memaksimalkan fiksasi CO₂ pada malam hari dan meminimalkan transpirasi pada siang hari (Albert & Carretero-Paulet 2015). Dengan kata lain, CAM sering dikaitkan dengan efisiensi penggunaan air (WUE- *water use efficiency*) dan CO₂ yang lebih baik dibanding C3 (Bone *et al.*

2015). Terkait dengan fotosintesis dan transpirasi, stomata merupakan tempat berlangsungnya pertukaran CO₂, O₂, dan uap air serta gerbang penghubung antara daun dengan atmosfer. Oleh karena itu densitas stomata (jumlah per satuan luas daun) merupakan salah satu karakter penting untuk diketahui (Xu & Zhou 2008). Karakter ini dikendalikan secara genetis dan dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Kalve *et al.* 2014).

Aklimatisasi merupakan tahapan adaptasi plantlet dari kondisi terkendali kultur *in vitro* ke kondisi lingkungan *ex vitro* yang tidak terkendali. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik stomata, meliputi ukuran, densitas, dan pola buka-tutupnya dalam kurun waktu 24 jam pada tiga jenis plantlet anggrek hasil kultur *in vitro* selama tahapan aklimatisasi di KREKB-LIPI. Ritme buka-tutup stomata dapat digunakan untuk mengestimasi tipe fotosintesis, apakah C3 atau CAM. Berdasarkan informasi hasil kajian pustaka, dapat dirumuskan hipotesis bahwa di antara tiga spesies anggrek alam yang diaklimatisasikan diduga terdapat perbedaan karakter buka-tutup stomata, yang mencirikan tipe fotosintesis C3 atau CAM. Informasi ini penting untuk mengetahui karakteristik tanaman terkait fiksasi CO₂ sehingga dapat dirumuskan tindakan yang sesuai dalam proses aklimatisasi dan pertumbuhan tanaman pasca kultur *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Kegiatan aklimatisasi tiga spesies anggrek alam telah dilaksanakan selama 16 bulan, mulai Februari 2013 – Mei 2014, di Rumah Kaca KREKB-LIPI, Candikuning, Baturiti, Tabanan, Bali. Lokasi penelitian terletak pada elevasi ± 1.350 m dpl., suhu udara 17–25°C pada siang hari dan 10-15°C pada malam hari. Pembuatan dan pengamatan *imprints* stomata dilakukan pada bulan April – Mei 2014. Pengamatan preparat cetakan stomata dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Sistemika Tumbuhan KREKB-LIPI.

Bahan Tanaman yang Digunakan

Data koleksi dari ketiga spesies anggrek alam pada penelitian ini adalah (1) *B. echinolabium*, No. Akses: E 200509127, berasal dari Sulawesi Selatan, (2) *D. fimbriatum*, No. Akses: E 198006152, berasal dari Gunung Merbuk, Bali, dan (3) *D. spectabile*, No. Akses: E 20060116, berasal dari Papua. Plantlet yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil kultur biji secara *in vitro* di Laboratorium Kultur Jaringan KREKB.

Biji tersebut diperoleh dari tanaman koleksi Taman Anggrek KREKB dan dikembalikan dalam media dasar Vacin Went (VW) tanpa pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) sehingga membentuk *protocorm like bodies* (PLB). *Protocorm like bodies* (PLB) kemudian diregenerasi dalam media VW dengan penambahan ZPT IAA 2 ppm, NAA 2 ppm, dan kinetin 0,5 ppm sehingga membentuk plantlet yang siap diaklimatisasi. Plantlet yang siap diaklimatisasi tersebut dipilih dengan ciri-ciri sebagai berikut: tinggi 2–4 cm, memiliki 3–5 buah daun berwarna hijau, perawakan plantlet kokoh, dan memiliki perakaran dengan lapisan velamen. Pada penelitian ini usia plantlet *D. spectabile* 4 tahun, sedangkan plantlet *B. echinolabium* dan *D. fimbriatum* berusia 6 tahun.

Prosedur Penelitian

Aklimatisasi Plantlet

Plantlet dikeluarkan dari botol kultur tanpa merusak akarnya dan dibersihkan dari sisa-sisa media dengan air mengalir. Proses pencucian ini diakhiri dengan perendaman plantlet dalam larutan fungisida Benlate® dengan dosis 2 g/l. Plantlet kemudian dikeringanginkan selama ± 6 jam. Selanjutnya akar plantlet dicelupkan dalam larutan Liquinox® Start B1 dosis 2,8 ml/l. Plantlet kemudian ditanam secara *single pot* pada pot dengan diameter 10 cm dengan media tanam campuran cacahan batang pakis dan arang kayu dengan perbandingan 3:1 v/v. Pot diletakkan dalam nampan dan disungkup.

Kegiatan aklimatisasi mulai dilakukan pada bulan ke-2 setelah penanaman. Sungkup plastik mulai dibuka-tutup selama 1–2 hari, berulang selama 1 bulan hingga plantlet tetap segar walaupun sungkup dibuka penuh. Setelah melewati tahap penyungkupan, perawatan selanjutnya berupa penyemprotan air 2–3 kali per minggu dan penyemprotan pupuk daun GrowMore® 32-10-10, dosis 2 g/liter satu kali per minggu.

Pembuatan dan Pengamatan Cetakan Stomata

Pengamatan stomata dilakukan pada plantlet yang berhasil diaklimatisasi (14–16 bulan setelah tanam) dengan teknik nondestruktif pada sisi abaksial sampel daun tua dan muda. Pertumbuhan plantlet setelah dilakukan aklimatisasi *D. fimbriatum* berupa pertambahan panjang batang dan kemunculan daun-daun baru pada ruas batang di ujung distal. Dengan demikian, sampel daun tua dan muda terletak pada batang yang sama. Sampel daun tua terletak pada ruas dekat dengan pangkal batang (proksimal), sedangkan daun muda pada ujung batang (distal). Anggrek *B. echinolabium* dan *D. spectabile* memiliki pola pertumbuhan simpodial. Tunas baru (yang

pada akhirnya membentuk *pseudobulb* dengan satu helai daun pada *B. echinolabium* dan beberapa helai daun dengan susunan berseling pada *D. spectabile*) tumbuh di samping plantlet yang berasal dari kultur *in vitro* setelah diaklimatisasi. Oleh karena itu pada *D. spectabile* dan *B. echinolabium*, sampel daun tua diambil dari batang/*pseudobulb* yang berasal dari plantlet dari botol kultur (*in vitro*), sedangkan sampel daun muda diambil dari batang/*pseudobulb* yang tumbuh setelah plantlet diaklimatisasi (*ex vitro*).

Pembuatan cetakan stomata dilakukan pada pagi hari saat matahari terbit (pukul 06.00 – 07.00), siang hari (pukul 13.00 – 14.00), sore hari setelah matahari terbenam (pukul 20.00–21.00), dan tengah malam (pukul 01.00 – 02.00). Pembuatan cetakan (*imprints*) stomata pada sisi abaksial dilakukan dengan metode cat kuku (Yan *et al.* 2012). Selain itu, dilakukan juga pengamatan faktor lingkungan di tempat aklimatisasi.

Hasil cetakan stomata diamati di bawah mikroskop cahaya (Olympus CX-5) dengan perbesaran 100 kali dan 400 kali. Tampilan cetakan stomata difoto dengan kamera digital Olympus C7070WZ. Format berkas foto digital berupa file jpg, representasi warna sRGB, ukuran 1.600 piksel × 1.200 piksel, serta resolusi vertikal dan horizontal 72 dpi. Pengolahan berkas foto digital (*cropping* serta pengaturan *brightness and contrast*) dilakukan dengan perangkat lunak GIMP. Selanjutnya, pengamatan panjang dan lebar stomata, serta karakteristik lain dilakukan dengan perangkat lunak ImageJ (Neuhauser 2009).

Peubah Pengamatan

Peubah stomata yang diamati mencakup densitas dan sirkularitas stomata. Variabel-variabel tersebut diperoleh secara tidak langsung dengan pengamatan foto *imprints*. Foto dengan perbesaran 100 digunakan untuk penentuan densitas stomata, sedangkan perbesaran 400 untuk penentuan sirkularitasnya. Perhitungan stomata dilakukan secara manual dengan bantuan *hand counter*, densitas dinyatakan dalam jumlah per luas bidang pandang mikroskop kemudian dikonversi dalam satuan jumlah per cm². Pengukuran panjang (p) dan lebar (l) tiga sampel foto *imprints* stomata, dilakukan secara acak untuk setiap unit pengamatan dengan perangkat lunak ImageJ. Nilai panjang dan lebar stomata tersebut dikonversi menjadi nilai sirkularitas (C) dengan persamaan (Neuhauser 2009).

$$C \approx \frac{2 \cdot p \cdot l}{p^2 + l^2}$$

Nilai C digunakan untuk menentukan apakah stomata sedang membuka atau menutup. Pada saat stomata membuka maka nilai C akan makin mendekati 1, sedangkan pada saat menutup nilainya makin kecil. Selanjutnya, pola buka-tutup stomata ini digunakan untuk menduga tipe fotosintesis (C3 atau CAM) pada jenis anggrek alam tersebut. Pada setiap waktu pembuatan *imprints*, dilakukan juga pengamatan suhu udara (°C), kelembapan nisbi (KN), udara (%), dan intensitas cahaya (Lux) dengan 4in1 meter Lutron® LM-8000.

Adapun peubah terkait pertumbuhan plantlet yang diamati mencakup persentase keberhasilan hidup dan jumlah daun. Jumlah plantlet yang bertahan hidup dimonitor secara periodik kemudian dilaporkan sebagai persentase keberhasilan aklimatisasi. Jumlah daun plantlet yang berhasil tumbuh diamati sebanyak tiga kali pada kurun waktu aklimatisasi, yaitu saat penanaman, 8 bulan setelah tanam, dan 16 bulan setelah tanam.

Analisis Data

Terhadap data kuantitatif dengan ulangan, yaitu densitas dan *circularity* stomata, dilakukan analisis varian (anova) untuk setiap jenis anggrek secara terpisah dengan model tersarang (*nested design*). Untuk mengetahui perbedaan antarnilai rerata perlakuan maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda

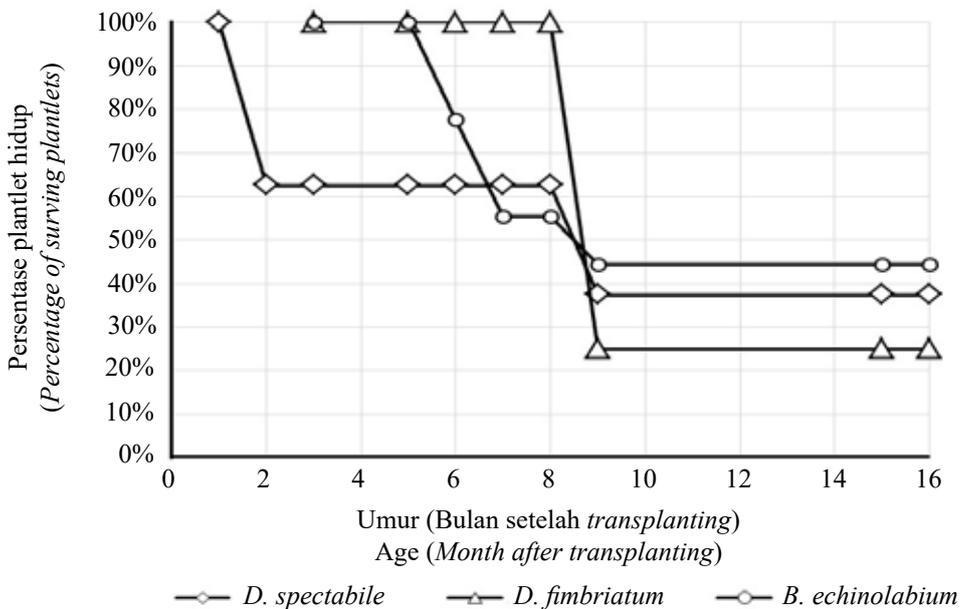
Duncan (*Duncan's Multiple Range Test/DMRT*) pada taraf nyata 95%. Adapun data kuantitatif tanpa ulangan, yaitu jumlah plantlet yang bertahan hidup, jumlah daun, dan data faktor lingkungan (suhu, kelembapan udara, dan intensitas cahaya), disajikan secara deskriptif dalam bentuk grafik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

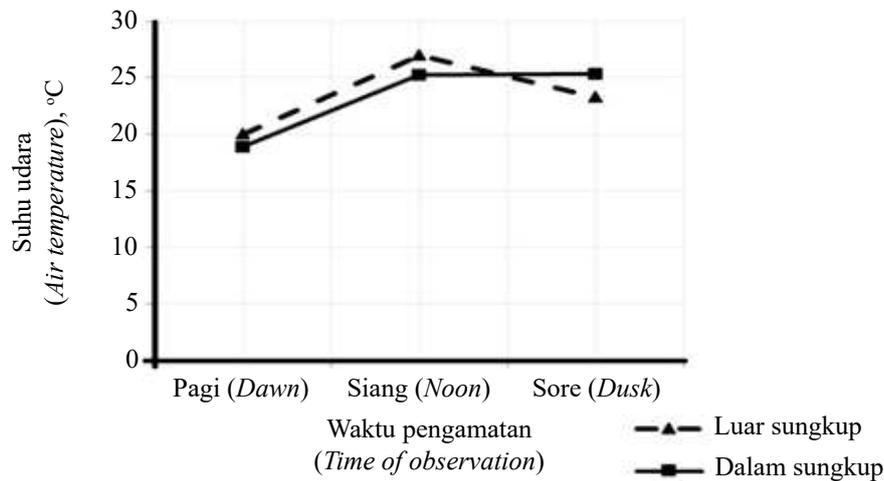
Persentase Keberhasilan Aklimatisasi

Persentase plantlet yang tetap hidup selama kurun waktu pelaksanaan aklimatisasi dapat dilihat pada Gambar 1. Dari ketiga jenis anggrek yang diamati, daya tahan *B. echinolabium* paling baik dengan persentase 45%, disusul oleh *D. spectabile* 37,5% dan terakhir *D. fimbriatum* 25%.

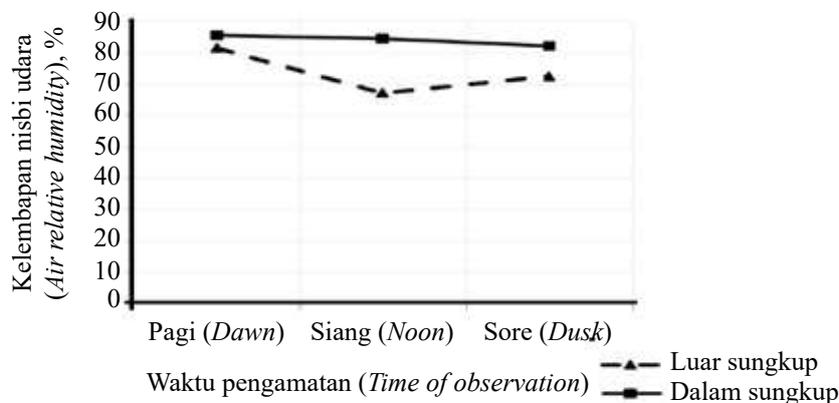
Secara umum dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa ada dua fase kritis saat terjadinya kematian plantlet *D. spectabile* dan *B. echinolabium*. Fase kritis pertama pada plantlet *D. spectabile* terjadi pada bulan pertama dan kedua setelah *transplanting* dari *in vitro* ke *ex vitro*, sedangkan pada plantlet *B. echinolabium* berlangsung pada bulan kelima dan tujuh setelah *transplanting*. Fase kritis kedua dari kedua jenis tersebut berlangsung pada bulan ke-8 dan 9 setelah *transplanting*. Adapun pada *D. fimbriatum* hanya



Gambar 1. Grafik persentase plantlet anggrek yang berhasil hidup selama kurun waktu aklimatisasi (jumlah awal plantlet *D. spectabile* = 16, *D. fimbriatum* = 4, *B. echinolabium* = 9) [A graph showing percentage of surviving orchid plantlets within the period of acclimatization (initial number of *D. spectabile* = 16, *D. fimbriatum* = 4, *B. echinolabium* = 9)]



Gambar 2. Grafik ayunan suhu udara antara luar sungkup dan dalam sungkup pada waktu pengamatan (*Fluctuation of air temperature between outer and inner containment during observation*)



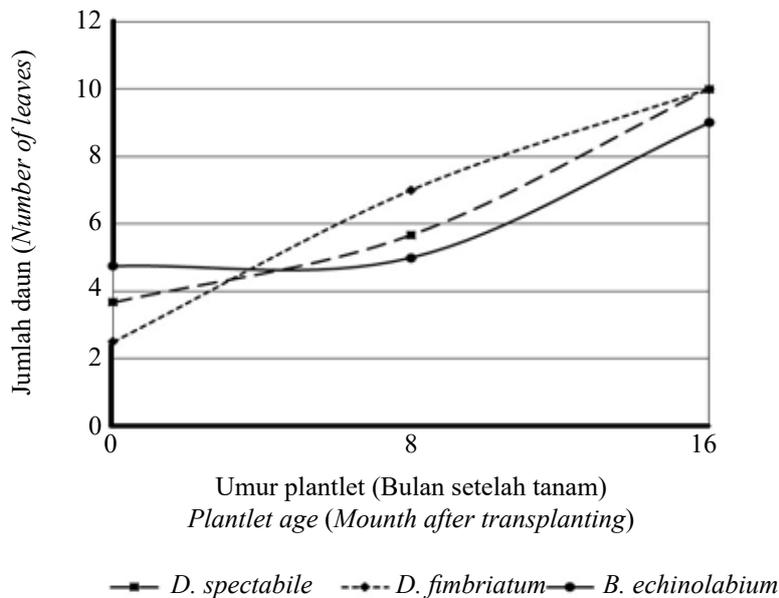
Gambar 3. Grafik ayunan kelembapan nisbi udara antara luar sungkup dan dalam sungkup pada waktu pengamatan (*Fluctuation of relative humidity between outer and inner containment during observation*)

terjadi satu fase kritis, yaitu 6 bulan setelah *transplanting*. Dalam penelitian ini, fase kritis pertama terjadi karena plantlet tidak mampu beradaptasi di lingkungan baru (setelah sungkup dibuka) sehingga menunjukkan gejala daun layu akhirnya kering dan mati. Fenomena tersebut tampaknya terkait dengan belum sempurnanya fungsionalitas stomata, lapisan kutikula daun, dan gangguan morfo-fisiologis plantlet hasil kultur *in vitro* (Hazarika 2006). Adapun berdasarkan observasi visual, ukuran plantlet saat keluar dari botol tampaknya sangat berpengaruh terhadap kemampuannya bertahan di lingkungan *ex vitro*. Plantlet dengan ukuran besar dapat bertahan, sedangkan plantlet berukuran kecil cenderung tidak bertahan (Warseno *et al.* 2014). Berdasarkan fakta di lapangan tersebut, manajemen dalam kultur *in vitro* untuk mendapatkan plantlet dengan ukuran besar dan seragam perlu diperhatikan.

Grafik ayunan suhu dan kelembapan nisbi udara di dalam dan luar sungkup disajikan pada Gambar 2 dan 3. Pemberian sungkup plastik pada awal masa

penanaman plantlet di lingkungan *ex vitro* penting dilakukan, untuk menciptakan faktor klimatik yang mendukung proses fisiologis plantlet. Terlihat pada Gambar 2 bahwa suhu udara di dalam dan di luar sungkup relatif sama. Namun demikian, penyungkupan menyebabkan kelembapan relatif udara yang lebih stabil dibandingkan kondisi di luar (Gambar 3). Seperti dikemukakan oleh (Hazarika 2003, 2006), kelembapan nisbi udara (RH) pada lingkungan *in vitro* pada umumnya sangat tinggi dan sangat terkendali yang berbeda dengan lingkungan *ex vitro* dengan fluktuasi yang jauh lebih drastis. Penyungkupan dilakukan untuk mengurangi fluktuasi RH sehingga dapat mengakomodasi kondisi morfo-fisiologis plantlet yang belum sempurna, untuk dapat bertahan di lingkungan baru.

Selain faktor morfo-fisiologis plantlet, peralihan dari lingkungan *in vitro* yang aseptik ke lingkungan *ex vitro* yang septik juga dapat menjelaskan ketidakberhasilan aklimatisasi sebagian besar plantlet *D. fimbriatum*. Kerusakan plantlet tampaknya terjadi



Gambar 4. Grafik jumlah daun plantlet dalam kurun waktu aklimatisasi (A graph showing the number of plantlet leaves within the period of acclimatization)

oleh serangan bakteri, dengan adanya gejala berupa *ooze* dan diikuti dengan membusuknya tajuk. Selain itu, teramati juga bahwa seiring berjalannya waktu, media tanam dalam pot *D. fimbriatum* menjadi sarang semut merah. Hal ini menunjukkan adanya asosiasi antara semut dengan *D. fimbriatum*.

Adapun fase kritis kedua terjadi karena adanya serangan hama hewan pengerat (*Mus musculus*). Dalam (Leonhardt & Sewake 1999) dijelaskan bahwa hama ini menyebabkan kerusakan serius khususnya pada anggrek *Dendrobium* sehingga aplikasi rodentisida disarankan untuk langkah pengendaliannya. Adapun di KREKB, untuk mencegah terulangnya kejadian sama untuk anggrek dalam tahap aklimatisasi maka telah dibuat kotak perlindungan plantlet dari kawat strimin. Langkah preventif ini terbukti efektif untuk mencegah gangguan dari hama tersebut. Oleh karena itu, asosiasi plantlet dengan organisme pengganggu tanaman (OPT) juga menjadi salah satu faktor yang harus diperhatikan dalam kegiatan aklimatisasi. Dalam hal ini, ketahanan setiap jenis anggrek terhadap suatu OPT juga berbeda-beda sehingga perhatian lebih perlu diberikan kepada jenis yang lebih rentan (Lakani *et al.* 2015).

Grafik jumlah daun plantlet dalam kurun waktu aklimatisasi disajikan pada Gambar 4. Gambar tersebut menunjukkan bahwa pertumbuhan tiga jenis plantlet anggrek alam yang diaklimatisasi sangat lambat, dengan penambahan daun 1–2 helai per 4 bulan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian (Wardani *et al.* 2013) yang menyatakan bahwa anggrek merupakan jenis tanaman dengan pertumbuhan lambat sehingga diperlukan upaya modifikasi faktor lingkungan

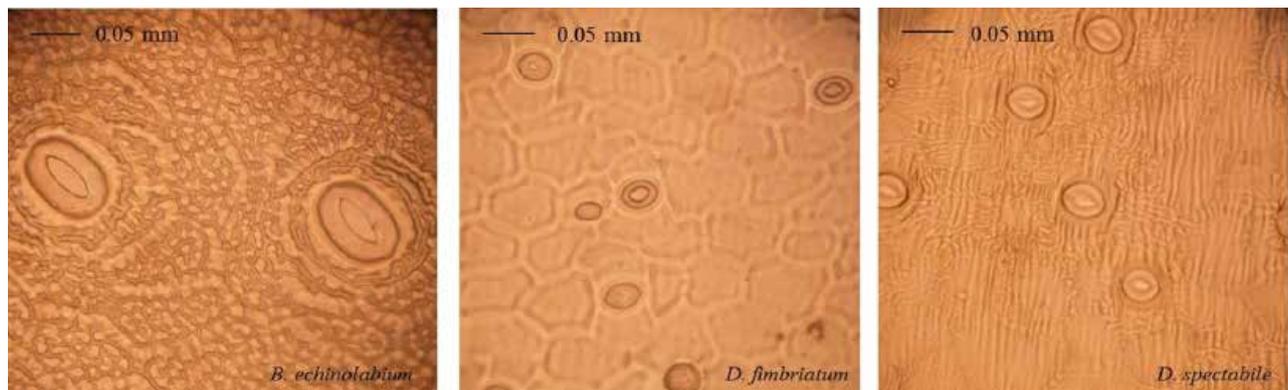
untuk memacu pertumbuhannya. Selain pada tahap aklimatisasi, pengaruh faktor lingkungan terhadap pertumbuhan plantlet juga diamati pada kondisi *in vitro*. Modifikasi komponen media agar sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan plantlet anggrek (Widiastoety & Kartikaningrum 2003, Widiastoety *et al.* 2009).

Dengan demikian, terdapat banyak faktor yang harus diperhatikan dalam mendukung keberhasilan proses aklimatisasi plantlet anggrek. Pada kasus aklimatisasi plantlet tiga jenis anggrek alam di KREKB, dapat dilaporkan bahwa paling tidak ada faktor internal dan eksternal yang berpengaruh. Faktor internal berupa karakter morfo-fisiologis plantlet, sedangkan faktor eksternal dapat dipilah menjadi faktor lingkungan abiotik (faktor klimatik dan edafik) serta faktor lingkungan biotik (interaksi plantlet dengan organisme lain, khususnya OPT). Selanjutnya, pemaparan hasil dan pembahasan akan difokuskan pada karakteristik morfo-fisiologis, terkait dengan organ daun dan stomata pada permukaan abaksialnya.

Morfologi dan Densitas Stomata

Stomata pada famili Orchidaceae diketahui sebagian hanya berada pada sisi abaksial daun (Goh *et al.* 1977). Hasil pengamatan morfologi dan ukuran stomata tiga jenis anggrek dalam penelitian ini ditampilkan pada Gambar 5.

Adapun hasil pengamatan densitas stomata dan luas daun sampel disajikan pada Tabel 1. (Lorenzo *et al.* 2010) menyebutkan bahwa densitas stomata pada tanaman epifit berkisar antara 100–



Gambar 5. Cetakan stomata pada ketiga jenis anggrek yang diaklimatisasi (400 kali) [*Stomatal imprints of three acclimatized orchid species (400 times)*]

Tabel 1. Densitas stomata daun tua dan muda plantlet anggrek yang di aklimatisasi (*Stomatal density of acclimatized orchid plantlets' old and young leaves*)

Jenis spesies (<i>Kind of species</i>)	Umur daun (<i>Leaf age</i>)	Densitas stomata (<i>Stomatal density</i>), per cm ²	Luas daun sampel (<i>Leaf area</i>), cm ²
<i>B. echinolabium</i>	Tua	680 b	11,3
	Muda	1.430 a	32,6
<i>D. fimbriatum</i>	Tua	1.730 a	4,8
	Muda	1.817 a	4,5
<i>D. spectabile</i>	Tua	4.837 a	2,7
	Muda	3.017 b	5,7

Untuk jenis anggrek yang sama, dalam satu kolom nilai rerata yang diikuti huruf sama tidak berbeda nyata menurut uji Duncan $\alpha = 5\%$ (*Remark: for the same species in a column, values followed by the same superscript are not significantly different based on Duncan test $\alpha = 5\%$*)

3.000 stomata/cm², dan 4.000–14.000 stomata/cm² pada daun dewasa beberapa jenis anggrek (Goh *et al.* 1977). Oleh karena itu, Tabel 1 memperlihatkan jumlah densitas stomata dari ketiga jenis anggrek dalam kisaran jumlah normal. Selanjutnya Gambar 2 menunjukkan bahwa dari ketiga jenis anggrek yang diaklimatisasi, ukuran stomata terbesar adalah *B. echinolabium* diikuti oleh *D. spectabile* dan *D. fimbriatum*. Dalam hal ini, ukuran stomata dapat dikaitkan dengan sensitivitas terhadap kekeringan dimana stomata besar lebih lambat bertanggap terhadap dehidrasi (Heterington & Woodward 2003). Dengan demikian, *Dendrobium* diperkirakan lebih tahan kering dibandingkan dengan *Bulbophyllum*.

Kolom luas daun sampel pada Tabel 1 menunjukkan adanya perbedaan karakter antara daun yang dihasilkan dari kondisi kultur *in vitro* (daun tua) dengan daun yang tumbuh di lingkungan *ex vitro* (daun muda). Pada jenis anggrek dengan pertumbuhan tunas baru disamping tunas yang sudah ada sebelumnya (*B. echinolabium* dan *D. spectabile*), daun muda lebih luas dibanding daun sebelumnya, masing-masing \pm tiga kali dan dua kali lipat. Adapun ukuran luas daun baru yang tumbuh pada batang yang sama (*D. fimbriatum*) relatif sama dengan daun tua, demikian juga halnya dengan densitas stomatanya (Tabel 1).

Fenomena menarik terjadi pada *B. echinolabium* dan *D. spectabile*. Meskipun daun muda keduanya lebih luas dibanding daun tua (tiga kali lipat), namun nilai densitas stomata keduanya tidak serta-merta sama-sama mengalami peningkatan atau penurunan. Hal yang terjadi adalah adanya peningkatan signifikan densitas stomata pada daun muda *B. echinolabium*, sedangkan hal yang sebaliknya terjadi pada *D. spectabile* (Tabel 1). Jika dilihat dari usia plantlet, *D. spectabile* lebih muda dari *B. echinolabium*. Hal ini dapat dijelaskan dengan perhitungan jumlah total stomata per daun tua dan muda. Terjadi pertambahan jumlah stomata per daun muda *B. echinolabium* sebanyak lebih dari lima kali lipat dibanding jumlah stomata per daun tua sebanyak \pm 7.600 buah, sedangkan pada daun muda *D. spectabile* hanya 0,3 kali lipat dari daun tuanya sejumlah \pm 4.800 buah. Akan tetapi perbedaan usia plantlet sejalan dengan yang terjadi pada *D. fimbriatum*. Oleh karena itu fenomena ini menunjukkan bahwa pengaturan densitas stomata terkait oleh faktor genetik (Kalve *et al.* 2014).

Ritme Harian Buka-Tutup Stomata

Ritme buka-tutup stomata tiga jenis anggrek dalam kurun waktu 24 jam disajikan pada Tabel 2 dan faktor-faktor klimatik pada saat pengamatan ditampilkan pada

Tabel 2. Stomatal circularity daun tua dan muda tiga jenis anggrek yang diaklimatisasi pada berbagai waktu pengamatan (Old and young leaves' stomatal circularity of the acclimatized orchids at observation time)

Jenis (Species)	Waktu (Time)	Nilai C* (C values)	
		Daun tua (Old leaves)	Daun muda (Young leaves)
<i>B. echinolabium</i>	Pagi (Dawn)	0,924 a	0,859 a
	Siang (Noon)	0,870 a	0,887 a
	Sore (Dusk)	0,874 a	0,880 a
	Malam (Night)	0,868 a	0,814 a
<i>D. fimbriatum</i>	Pagi (Dawn)	0,884 b	0,974 a
	Siang (Noon)	0,940 ab	0,922 b
	Sore (Dusk)	0,982 a	0,970 a
	Malam (Night)	0,974 a	0,989 a
<i>D. spectabile</i>	Pagi (Dawn)	0,954 ab	0,954 b
	Siang (Noon)	0,921 b	0,985 a
	Sore (Dusk)	0,800 c	0,984 a
	Malam (Night)	0,988 a	0,982 a

Untuk jenis anggrek yang sama, dalam satu kolom nilai rerata yang diikuti huruf sama tidak berbeda nyata menurut uji Duncan $\alpha = 5\%$ (For the same species in a column, values followed by the same superscript are not significantly different based on Duncan test $\alpha = 5\%$)

Gambar 3. Selain untuk menjelaskan fenomena buka-tutup stomata, Gambar 3 menunjukkan bahwa kisaran suhu selama waktu penelitian tidak jauh berbeda dengan kebutuhan suhu anggrek yang diaklimatisasi. Dalam hal ini, ketiga jenis anggrek tersebut termasuk dalam jenis anggrek yang membutuhkan suhu sedang (10–29°C) dan hangat (16–32°C).

Berdasarkan data pada Tabel 2, dapat dilihat bahwa stomata jenis *Dendrobium* membuka pada malam hari, sedangkan *Bulbophyllum* pada siang hari, pada kondisi faktor klimatik yang sama (Gambar 3). Dengan demikian, dapat dinyatakan bahwa ada faktor internal tanaman yang mengatur ritme buka-tutup stomata. Fenomena fiksasi CO₂ dan membukanya stomata pada malam hari serta menutupnya stomata pada siang hari untuk meminimalkan laju transpirasi merupakan ciri jenis tanaman dengan tipe fotosintesis CAM, sedangkan ritme sebaliknya terjadi pada jenis tanaman dengan tipe fotosintesis C3 atau C4 (Hew & Yong 2004, Bone *et al.* 2015, Winter *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa dengan pengamatan ritme buka-tutup stomata tersebut, dapat diketahui bahwa *D. fimbriatum* dan *D. spectabile* adalah anggrek dengan tipe fotosintesis CAM, di lain pihak *B. echinolabium* bertipe fotosintesis C3.

Perbandingan jalur fotosintesis pada jenis C3 dengan CAM menjadi penting apabila dikaitkan dengan *trade-off* antara laju fotosintesis dengan transpirasi (WUE), yang berpengaruh terhadap ketahanan cekaman

kekeringan dan juga laju pertumbuhan. Dalam hal ini, stomata memiliki peran penting dalam mengatur keseimbangan masuknya CO₂ dan keluarnya uap air. (Lorenzo *et al.* 2010) menyebutkan bahwa ukuran dan densitas stomata memengaruhi *stomatal conductance* suatu tanaman. *Stomatal conductance* ialah laju masuknya CO₂ dan keluarnya air melalui stomata. Oleh karena itu jika nilai *stomatal conductance* rendah maka dapat membatasi jumlah CO₂ yang masuk dan air yang keluar (Orsini *et al.* 2012). Dengan demikian, tanaman dapat mengatur mekanisme buka tutup dan densitas stomata yang disesuaikan dengan kondisi lingkungannya (Yan *et al.* 2012). Oleh karena itu perbedaan kondisi lingkungan akan memberikan perubahan terhadap aspek anatomi maupun fisiologi plantlet anggrek selama tahapan aklimatisasi. Densitas stomata menunjukkan jumlah stomata per unit area (cm²), makin tinggi densitas stomata maka makin besar CO₂ yang masuk dan air yang dilepaskan (Xu & Zhou 2008). Dua parameter tersebut menentukan laju fotosintesis dan transpirasi sehingga menentukan pula daya tahan hidup tanaman selama masa transisi dari fase *in vitro* ke *ex vitro*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Persentase keberhasilan aklimatisasi tiga jenis plantlet anggrek hasil kultur *in vitro* di KREKB antara 25–46%. Penyebab ketidakberhasilan tumbuhnya sebagian besar

plantlet di lingkungan *ex vitro* selain dari faktor internal plantlet seperti *morpho-physiological disorder* dan ukuran plantlet yang terlalu kecil juga karena adanya faktor eksternal seperti serangan hama dan penyakit.

Terdapat perbedaan karakter stomata antara daun tua dan muda yang menunjukkan adanya perubahan respons plantlet dari lingkungan *in vitro* ke *ex vitro* (ukuran luas daun, densitas stomata) dan juga adanya karakter yang dikontrol oleh faktor genetik (ritme buka tutup stomata). Berdasarkan ritme buka-tutup stomata, *D. fimbriatum* dan *D. spectabile* adalah jenis anggrek dengan tipe fotosintesis CAM, sedangkan *B. echinolabium* bertipe C3.

Terkait dengan perbedaan karakteristik *Bulbophyllum* dengan *Dendrobium*, sebaiknya tindakan perawatan seperti intensitas pemberian air dan perlakuan pemupukan perlu disesuaikan. *Dendrobium* dengan tipe fotosintesis CAM diperkirakan lebih tahan kering dibandingkan *Bulbophyllum* dengan tipe fotosintesis C3 sehingga intensitas pemberian air semestinya tidak bisa disamakan. Aplikasi pupuk daun sebaiknya juga disesuaikan dengan waktu terbukanya stomata, yaitu pagi hari untuk *Bulbophyllum* dan sore hari untuk *Dendrobium*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Kepala dan Kasie Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Eka Karya Bali-LIPI yang telah mendukung penuh kegiatan ini. Kepada Sdr. Riksa Parikrama (Jurusan Biologi ITB), terima kasih atas pengujian metode pengamatan stomata ini pada praktik kerja lapangan di KREKB-LIPI pada tahun 2012. Tidak lupa juga diucapkan terima kasih kepada dua *reviewer* anonim, atas saran perbaikan naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Albert, VA & Carretero-Paulet, L 2015, 'A genome to unveil the mysteries of orchids', *Nat. Genet.*, vol. 47, pp. 3-4.
2. Bone, RE, Smith, JAC, Arrigo, N & Buerki, S 2015, 'A macroecological perspective on crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis evolution in Afro-Madagascan drylands: Eulophiinae orchids as a case study', *New Phytologist*, vol. 208, pp. 469-81.
3. Goh, CJ, Avadhani, PN, Loh, CS, Hanegraaf, C & Arditti, J 1977, 'Diurnal stomatal and acidity rhythms in orchid leaves', *New Phytologist*, vol. 78, pp. 365-72.
4. Hazarika, BN 2003, 'Acclimatization of tissue-cultured plants', *Curr. Sci.*, vol. 85, no. 1.
5. Hazarika, BN 2006, 'Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants', *Sci. Hort.*, vol. 108, pp. 105-20.
6. He, J, Khoo, G & Hew, C 1998, 'Susceptibility of CAM *Dendrobium* leaves and flowers to high light and high temperature under natural tropical conditions', *Env. Exp. Bot.*, vol. 40, pp. 255-64.
7. Heterington, A & Woodward, F 2003, 'The role of stomata in sensing and driving environmental change', *Nature*, vol. 424, pp. 901-8.
8. Hew, CS & Khoo, SIG 1980, 'Photosynthesis of young orchid seedlings', *New Phytologist*, vol. 86, pp. 349-57.
9. Hew, CS & Yong, JWH 2004, *The physiology of tropical orchids in relation to the industry*, World Scientific, Singapore.
10. Isnaini, Y, Hendriyani, E & Nurfadilah 2011, 'Konservasi *in-vitro* dan perbanyakan anggrek alam di Kebun Raya Indonesia', *Prosiding Seminar Nasional HUT Kebun Raya Cibodas ke-159*, hlm. 539-43.
11. Kalve, S, De Vos, D & Beemster, GT 2014, 'Leaf development: A cellular perspective', *Front. in Plant Sci.*, vol. 5, pp. 1-25.
12. Lakani, I, Suastika, G, Damayanti, T & Mattjik, N 2015, Respons ketahanan beberapa spesies anggrek terhadap infeksi odontoglossum ringspot virus', *J. Hort.*, vol. 25, hlm. 71-7.
13. Leonhardt, K & Sewake, K 1999, *Growing Dendrobium orchids in Hawaii: Production and pest management guide*, CTAHR, Hawaii.
14. Lorenzo, N, Mantuano, DG & Mantovani, A 2010, 'Comparative leaf ecophysiology and anatomy of seedlings, young and adult individuals of the epiphytic aroid *Anthurium scandens* (Aubl.)', *Engl. Env. Exp. Bot.*, vol. 68, pp. 314-22.
15. Neuhauser, C 2009, *A brief introduction to using imagej, dirilis 23 Mei 2009*, diunduh 07 Oktober 2015, <http://www.bioquest.org/NumbersCount/utk_2009/projectfiles/A%20Brief%20Introduction%20to%20Using%20ImageJ.pdf>.
16. Orsini, F, Alnayef, M, Bona, S, Maggio, A & Gianquinto, G 2012, 'Low stomatal density and reduced transpiration facilitate strawberry adaptation to salinity', *Env. Exp. Bot.*, vol. 81, pp. 1-10.
17. Wardani, S, Setiado, H & Ilyas, S 2013, 'Pengaruh media tanam dan pupuk daun terhadap aklimatisasi anggrek dendrobium (*Dendrobium* sp.)', *Jurnal Ilmu Pertanian KULTIVAR* 5, hlm. 11-8.
18. Warseno, T, Hendriyani, E & Priyadi, A 2014, 'Konservasi dan propagasi *Bulbophyllum echinolabium* JJ, Sm, melalui kultur *in vitro*', *Prosiding Ekspose Pembangunan Kebun Raya dan Seminar Konservasi Flora Indonesia Membangun Kebun Raya untuk Penyelamatan Keanekaragaman Hayati dan Lingkungan Menuju Ekonomi Hijau*, PKT KR Bogor – LIPI, hlm. 773-84.
19. West-Eberhard, MJ, Smith, JAC & Winter, K 2011, 'Photosynthesis, reorganized', *Science.*, vol. 332, pp. 311-2.
20. Widiastoety, D & Kartikaningrum, S 2003, 'Pemanfaatan ekstrak ragi dalam kultur *in vitro* plantlet media anggrek', *J. Hort.*, vol. 13, hlm. 82-6.
21. Widiastoety, D, Solvia, N & Kartikaningrum, S 2009, 'Pengaruh thiamin terhadap pertumbuhan plantlet anggrek *Oncidium* secara *in vitro*', *J. Hort.*, vol. 19, pp. 35-39.
22. Winter, K, Holtum, JAM & Smith, JAC 2015, 'Crassulacean acid metabolism: A continuous or discrete trait', *New Phytol.*, vol. 208, pp. 73-8.

23. Xu, Z & Zhou, G 2008, 'Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass', *J. Exp. Bot.*, vol. 59, pp. 3317-25.
24. Yan, F, Sun, Y, Song, F & Liu, F 2012, 'Differential responses of stomatal morphology to partial root-zone drying and deficit irrigation in potato leaves under varied nitrogen rates', *Sci. Hort.*, vo. 145, pp. 76-83.
25. Zhang, L, Chen, F, Zhang, GQ, Zhang, YQ, Niu, S, Xiong, JS, Lin, Z, Cheng, ZM (Max) & Liu, ZJ 2016, 'Origin and mechanism of crassulacean acid metabolism in orchids as implied by comparative transcriptomics and genomics of the carbon fixation pathway', *The Plant J.*, vol. 86, pp. 175-85.