
KONSERVASI ANGGREK ALAM INDONESIA *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* MELALUI KULTUR EMBRIO SECARA IN-VITRO

Rindang Dwiyani^{1)2)*}, Azis Purwantoro^{2)3)**}, Ari Indrianto^{2)4)***},
and Endang Semiarti^{2)4)****}

¹⁾ Fakultas Pertanian Universitas Udayana, Bali

²⁾ Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³⁾ Fakultas Pertanian Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

⁴⁾ Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Email : *rindangdwiyani@yahoo.com; **ronsasm@hotmail.com; ***ariindri@gadjahmada.edu;
****esemiart@yahoo.com

Abstracts

Vanda tricolor Lindl. var. *suavis* is an Indonesian wild orchid which is now extremely rare in nature due to its habitat destruction. Development of an appropriate method for propagation of this species through in vitro culture could be necessary for conservation purposes. High phenolic content of plant tissue is a serious problem for *V. tricolor* research in the laboratory, which inhibits germination and growth of the embryo. To overcome this problem, seeds were sown in a medium with the addition of tomato extract as an antioxidant. The aim of this research is to find the most suitable concentration of tomato extract for germination and growth of the embryo of *V. tricolor* from Bali and Merapi in order to obtain healthy seedlings for conservation purposes. Orchid pods (7 months after pollination) of *V. tricolor* Bali and Merapi were used as plant material. The treatment consisted of 5 concentrations of tomato extract which is 0, 50, 100, 150, 200, 250 g L⁻¹. Observation was done by counting the number of protocorms for each stage of growth at 4 weeks after seed sowing. The study concluded that *V. tricolor* Bali is more responsive to the tomato extract compared with Merapi. Concentration of 150 g L⁻¹ tomato extract gave the highest percentage of protocorms for Bali form, whereas Merapi form did not give significant differences either with or without tomato extract added in the culture medium.

Keywords : germination, tomato extract, protocorm, *V. tricolor*, forma Bali, forma Merapi

1. Pendahuluan

Pemerintah Indonesia, melalui Departemen Pertanian menetapkan tanaman anggrek sebagai komoditas hortikultura unggulan yang memiliki prospek agribisnis untuk dikembangkan (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2007). Di dunia terdapat lebih dari 30000 spesies anggrek alam, 75% diantaranya terdapat di daerah tropis (Banks, 1999) dan di Indonesia terdapat kurang lebih 5000 spesies (Irawati, 2002). Salah satu diantara ribuan spesies anggrek alam tersebut adalah *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis*.

Daerah penyebaran anggrek *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis* di Indonesia adalah Jawa timur, Jawa Barat, D.I. Yogyakarta, Bali dan Sulawesi (Gardiner,

2007). Spesies *V. tricolor* di habitat asalnya dilaporkan mulai langka akibat adanya kerusakan hutan karena bencana alam maupun ulah manusia. Kerusakan hutan akibat erupsi Merapi pada bulan Oktober 2010 menyebabkan spesies *V. tricolor* var. *suavis* di lereng Merapi kini secara ekologi dapat dikatakan terancam punah. Dengan alasan tersebut, maka perlu dilakukan suatu usaha konservasi baik konservasi secara *in situ* maupun *ex situ*. Konservasi *ex situ* dapat dilakukan dengan cara perbanyakan tanaman di luar habitatnya, baik ditanam di pekarangan penduduk maupun perbanyakan di *nursery* anggrek atau di kebun percobaan lembaga penelitian dan perguruan tinggi.

Perbanyakan melalui kultur in-vitro adalah

metode perbanyakan yang sangat bermanfaat bagi spesies langka untuk tujuan konservasi dan hal ini sangat berguna untuk tanaman anggrek (Lo *et al.*, 2004; Santoz-Herandez *et al.*, 2005) karena biji anggrek tidak memiliki cadangan makanan, sehingga di alam memerlukan bersimbiose dengan fungi tertentu untuk berkecambah dengan pertumbuhan yang sangat lambat (Duta *et al.*, 2011). Istilah 'embrio' diberikan untuk biji anggrek karena kondisinya yang tanpa cadangan makanan tersebut (Semiarti *et al.*, 2007).

Perbanyakan anggrek melalui kultur embrio secara *in-vitro* memberi peluang untuk dipertahankannya variabilitas genetik tanaman (Avila-Diaz *et al.*, 2009), namun protokol untuk kultur *in-vitro* biji anggrek sangat spesifik untuk masing-masing spesies dan salah satunya tergantung pada media pertumbuhan (Arditti, 1992; Stewart dan Kane 2006). Sejauh ini riset untuk perkecambahan embrio anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* masih sangat sedikit dilaporkan.

Permasalahan yang spesifik dimiliki dengan riset *V. tricolor* di laboratorium yaitu seringkali terjadi pencoklatan (*browning*) dengan intensitas yang tinggi pada medium pertumbuhan. Kandungan fenolik yang relatif tinggi pada jaringan tanaman diduga memicu terjadinya pencoklatan tersebut, dengan demikian diperlukan upaya untuk mengatasinya.

Dalam penelitian ini digunakan ekstrak tomat untuk mengatasi pencoklatan pada kultur embrio *V. tricolor*, karena ekstrak buah tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mengandung vitamin C, antioksidan, gula dan senyawa lainnya sehingga dapat meningkatkan perkecambahan dan pertumbuhan protokorm anggrek (Arditti and Ernst, 1993), selain itu karena pertumbuhan embrio anggrek secara umum membutuhkan ekstrak bahan organik (Dodds, 1993; Dodds dan Roberts, 1995).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak tomat yang paling sesuai (yang harus ditambahkan pada media kultur) untuk pertumbuhan embrio anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali dan forma Merapi sebagai upaya mendapatkan bibit (*seedling*) anggrek yang sehat untuk tujuan konservasi.

2. Metodologi

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas

Gadjahmada, Yogyakarta selama 4 bulan, Juli-Oktober 2010. Bahan yang digunakan adalah buah *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* umur 7 bulan setelah polinasi, yakni Forma Bali yang diperoleh dari daerah Bedugul (Bali) dan forma Merapi dari lereng Gunung Merapi (Daerah Istimewa Yogyakarta). Buah anggrek *V. tricolor* Lindl. dipanen, dicuci bersih, dicelupkan dalam spritus dan dibakar (hingga 3 kali) dan kemudian dimasukkan ke dalam *Laminar Air Flow* untuk ditabur embrionya pada media yang sudah disiapkan. Embrio ditabur pada media dasar *New Phalaenopsis/NP* (Islam *et al.*, 1998) yang ditambah dengan ekstrak tomat dengan beragam konsentrasi (0, 50, 100, 150, 200, 250 gL⁻¹ ekstrak tomat) sebagai perlakuan.

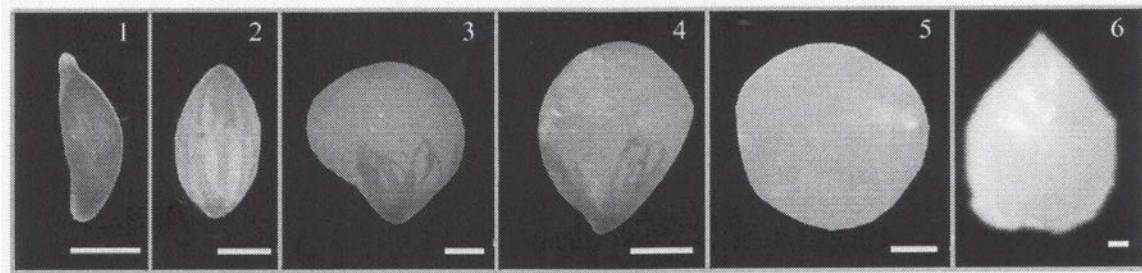
Observasi terhadap pertumbuhan embrio dilakukan mulai minggu ke 1 hingga minggu ke 10 setelah penanaman dan dilakukan pengambilan gambar secara periodik dibawah mikroskop. Untuk memudahkan observasi dan pendataan secara kuantitatif, maka dilakukan penentuan fase-fase pertumbuhan seperti yang dilakukan oleh Semiarti *et al.* (2007) terhadap *P. amabilis*. Fase-fase pertumbuhan dan perkembangannya pada *V. tricolor* ini ditentukan berdasarkan perkembangannya mengikuti perubahan warna dan ukuran yang terjadi pada embrio, dan diamati secara periodik pada obyek yang sama.

Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah embrio berdasar fase-fase yang sudah ditentukan tersebut secara *in silico* (berdasarkan hasil pemotretan di bawah mikroskop). Persentase embrio fase ke-n = (jumlah embrio pada fase ke-n / jumlah total embrio) x 100%.

Rancangan statistik yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Data diolah menggunakan *Analysis of Variance*, dan untuk perbedaan rata-rata antar perlakuan digunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf 5%.

3. Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan embrio *V. tricolor* dari buah yang berumur 7 bulan setelah polinasi diikuti perkembangannya. Berdasarkan morfologi embrio dibuat pengelompokan perkembangan embrio fase 1 sampai dengan 6 dengan kriteria tertentu dan didapatkan morfologi yang sama untuk kedua forma (Gambar 1). Selanjutnya, berdasarkan fase-fase ini dilakukan kuantifikasi terhadap pertumbuhan embrio berdasarkan fase-fasenya.



Gambar 1. Perkembangan embrio anggrek *V. tricolor* dari buah berumur 7 bulan setelah polinasi: Fase 1 = embrio anggrek sebelum ditanam; Fase 2 = embrio membengkak, tampak bergaris-garis warna coklat menunjukkan testa yang pecah; Fase 3 = embrio tidak memiliki testa, bentuk bulat atau oval, warna putih, tampak testa masih tersisa; Fase 4 = ukuran embrio membesar, bentuk bulat, warna kuning, testa masih tersisa; Fase 5 = ukuran embrio membesar, bentuk bulat, warna hijau; Fase 6= Shoot Apical Meristem (SAM) terdeteksi, warna hijau. Skala = 100 μ m.

Tabel 1 dan Tabel 2 memperlihatkan pertumbuhan embrio anggrek *Vanda tricolor* Lindl. pada umur 4 minggu setelah semai untuk forma Bali (Tabel 1) dan forma Merapi (Tabel 2) dari buah yang berumur 7 bulan setelah polinasi..

Pada umur 4 minggu setelah semai, tidak ditemukan adanya protokorm yang memasuki fase 5 dan 6 untuk semua perlakuan, baik pada forma Bali maupun Merapi.. Semua perlakuan (termasuk kontrol) menghasilkan protokorm fase 4, namun perlakuan ekstrak tomat 100g L⁻¹ memberikan persentase protokorm fase 4 tertinggi untuk forma Bali maupun Merapi, akan tetapi secara statistik hanya forma Bali yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Data ini menunjukkan bahwa

forma Bali memberikan respon yang lebih baik terhadap ekstrak tomat. Forma Merapi menunjukkan perbedaan yang tidak nyata secara statistik antara perlakuan ekstrak tomat dengan kontrol pada hampir semua fase pertumbuhan yang diamati. Artinya bahwa, dengan ataupun tidak diberi ekstrak tomat, *V. tricolor* Lindl. forma Merapi memiliki pertumbuhan yang relatif sama.

Menurut Arditti (1991), perkecambahan embrio anggrek dimulai dengan pembengkakan embrio, diikuti kemunculan embrio dari testa, sampai hilangnya testa dari embrio. Dengan demikian maka embrio anggrek dikatakan sudah berkecambah jika testa sudah benar-benar terlepas atau memasuki fase 3. Istilah protokorm diberikan untuk embrio tanpa

Tabel 1. Pengaruh media diperkaya dengan ekstrak tomat terhadap pertumbuhan embrio anggrek *V.tricolor* Lindl. forma Bali , 4 minggu setelah semai

Perlakuan	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
T0 (Kontrol)	37.58% a	54.98% ab	7.31% d	0.13% b
T1	34.95% ab	46.44% ab	18.02% c	0.59% b
T2	26.11% bc	43.07% b	28.17% b	2.65% a
T3	14.46% c	43.56% b	41.70% a	0.28% b
T4	14.73% c	60.05% a	25.09% bc	0.13% b
T5	12.64% c	61.85% a	25.46% bc	0.05% b
BNT 5%	17.09	15.94	9.94	0.69

Keterangan: nilai rata-rata pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama, berbeda tidak nyata dengan uji BNT taraf 5%. T0 = tanpa ekstrak tomat (kontrol), T1=50 gL⁻¹ ekstrak tomat, T2=100 gL⁻¹ ekstrak tomat, T3=150 gL⁻¹ ekstrak tomat, T4=200 gL⁻¹ ekstrak tomat dan T5=250 gL⁻¹ ekstrak tomat.

Tabel 2. Pengaruh media diperkaya dengan ekstrak tomat terhadap pertumbuhan embrio anggrek *V.tricolor* Lindl. forma Merapi, 4 minggu setelah semai

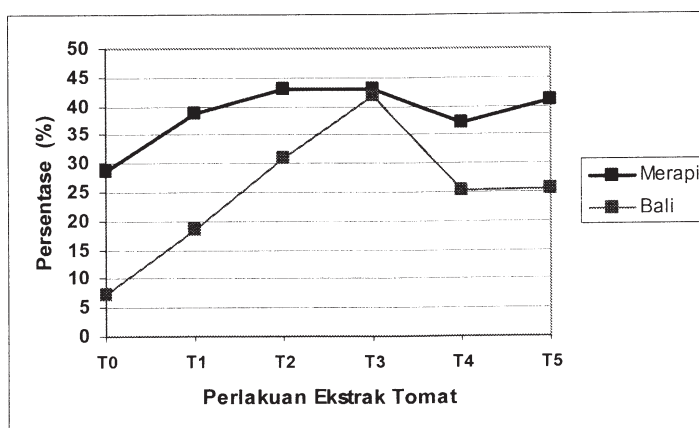
Perlakuan	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
T0 (Kontrol)	14.76% a	56.47% a	28.77% a	0.00% a
T1	8.57% a	52.71% a	38.69% a	0.03% b
T2	10.87% a	46.23% a	41.34% a	1.56% b
T3	7.82% a	49.20% a	42.25% a	0.73% b
T4	9.27% a	53.54% a	37.15% a	0.04% b
T5	6.82% a	52.30% a	40.88% a	0.00% b
BNT 5%	8.55	12.71	13.96	0.79

Keterangan: nilai rata-rata pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama, berbeda tidak nyata dengan uji BNT taraf 5%. T0 = tanpa ekstrak tomat (kontrol), T1=50 gL⁻¹ ekstrak tomat, T2=100 gL⁻¹ ekstrak tomat, T3=150 gL⁻¹ ekstrak tomat, T4=200 gL⁻¹ ekstrak tomat dan T5=250 gL⁻¹ ekstrak tomat.

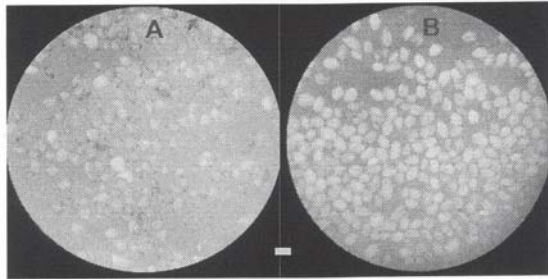
testa, sehingga berdasarkan warna dibedakan menjadi protokorm putih (*white protocorm*), protokorm kuning (*yellow protocorm*), protokorm hijau (*green protocorm*) (Semiarti *et al*, 2007). Biji anggrek dikatakan sudah berkecambah jika sudah memasuki fase **protokorm** yaitu fase untuk embrio tanpa testa atau embrio yang sudah berkecambah (fase 3, 4, dan seterusnya).

Perbedaan respon kedua forma terhadap pemberian ekstrak tomat dapat dilihat dengan jelas pada Gambar 2. Pada forma Bali tampak jelas

perbedaan antar perlakuan, dan perlakuan ekstrak tomat 150g L⁻¹ memberikan persentase fase protokorm tertinggi, pada konsentrasi melebihi 150g L⁻¹ persentase protokorm menurun. Tanpa ekstrak tomat, embrio *V. tricolor* forma Bali berkecambah (menjadi protokorm) dibawah 10%, sedangkan forma Merapi mencapai hampir 30% (Gambar 2). Gambar 3 memperlihatkan kondisi embrio/protokorm dari kedua forma pada media tanpa ekstrak tomat pada 4 minggu setelah semai.



Gambar 2. Persentase fase protokorm (embrio tanpa testa) pada berbagai perlakuan ekstrak tomat untuk *V.tricolor* forma Bali dan Merapi (dari buah 7 bulan setelah polinasi) pada 4 minggu setelah semai. T0 = tanpa ekstrak tomat (kontrol), T1=50 gL⁻¹ ekstrak tomat, T2=100 gL⁻¹ ekstrak tomat, T3=150 gL⁻¹ ekstrak tomat, T4=200 gL⁻¹ ekstrak tomat dan T5=250 gL⁻¹ ekstrak tomat



Gambar 3. Embrio /protokorm *V. tricolor* forma Bali (A) dan forma Merapi (B) pada media dasar *New Phalaenopsis* (NP) tanpa ekstrak tomat. Lebih banyak dijumpai embrio tanpa testa (warna putih) pada forma Merapi (B) dibandingkan forma Bali (A). Skala = 300 μ m.

Stewart dan Kane (2006) menyebutkan bahwa media pertumbuhan untuk embrio angrek sangat bervariasi dan sangat spesifik untuk masing-masing spesies. Data penelitian ini membuktikan bahwa respon perkecambahan embrio angrek terhadap media dengan penambahan ekstrak tomat sangat spesifik dan berbeda untuk forma pada spesies yang sama. Gambar 2 dan Gambar 3 sangat jelas menunjukkan bahwa penambahan ekstrak tomat pada media merupakan suatu keharusan bagi embrio angrek *V. tricolor* untuk perkecambahan dan pertumbuhannya, namun tidak demikian dengan forma Merapi karena perkecambahan embrio dapat mencapai 30% meskipun tanpa ekstrak tomat. Perbedaan respon ini diduga karena adanya perbedaan inhibitors (penghambat) untuk perkecambahan yang dimiliki oleh embrio dari masing-masing forma. Adanya zat penghambat ini akan mempengaruhi aktivasi enzim yang menginisiasi proses perkecambahan dan pertumbuhan.

Hasil analisis dengan metode kromatografi untuk kandungan senyawa dalam buah tomat yang digunakan dalam penelitian ini (Dwiyani dkk., 2009) menunjukkan bahwa ekstrak buah tomat mengandung vitamin C, dan karoten total yang tinggi yang kesemuanya berfungsi untuk mengatasi oksidasi senyawa fenolik dan mencegah pencoklatan. Dan (2008) menyebutkan bahwa vitamin C juga dapat menstimulasi organogenesis, embriogenesis somatik dan pertumbuhan tunas

dalam mikropropagasi pada beragam spesies tanaman. Diantara mineral yang dikandung buah tomat, unsur K menunjukkan nilai paling tinggi. Unsur K dalam media berfungsi untuk hidrasi karena mempermudah pembentukan misel (kantong air) dalam dinding sel, sehingga lebih mudah menyerap air (George dan Sherington, 1984). Penyerapan air yang lebih mudah ini, mempercepat terjadinya pembengkakan embrio (swollen) yang diikuti oleh pecahnya testa dan lepasnya testa dari embrio, sehingga mempercepat terjadinya perkecambahan embrio angrek.

Buah tomat yang masak (*fully ripe*) mengandung sitokinin dengan konsentrasi yang rendah, sitokinin dalam buah tomat berkurang seiring masaknyanya buah tomat. Desai dan Chism (2006) menyebutkan bahwa dari 1000g buah tomat hijau didapatkan 10.35 μ g benzylaminopurin, sedangkan dari 1000g buah tomat yang sudah masak merah mengandung 0.15 μ g benzylaminopurin. Neumann *et al.* (2009) menyebutkan bahwa fitohormon dalam konsentrasi rendah memiliki efek stimulan yang spesifik pada tanaman, sedangkan pada konsentrasi tinggi memiliki efek menghambat. Hal ini menjelaskan bahwa konsentrasi ekstrak tomat 150 gL⁻¹ memberikan hasil terbaik terhadap perkecambahan embrio angrek *V. tricolor* Lindl forma Bali, karena pada konsentrasi ekstrak tomat yang lebih tinggi, kandungan fitohormon meningkat sehingga diduga memiliki efek menghambat pada pertumbuhan embrio.

4. Simpulan dan Saran

Penelitian ini menyimpulkan bahwa embrio *Vanda tricolor* forma Bali lebih responsif terhadap pemberian ekstrak tomat untuk pertumbuhan dan perkecambahannya dibandingkan forma Merapi. Untuk menghasilkan bibit angrek yang sehat dalam waktu cepat, maka pada media kultur embrio angrek *V. tricolor* forma Bali (dari buah umur 7 bulan setelah polinasi) perlu ditambahkan 150 gL⁻¹ ekstrak tomat, namun tidak disarankan untuk forma Merapi.

Disarankan untuk dilakukan penelitian serupa pada umur buah yang berbeda karena kondisi internal embrio sangat besar pengaruhnya terhadap respon embrio tersebut pada kondisi lingkungan *in vitro*.

Daftar Pustaka

- Arditi, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Arditti, J. and Ernst, R. 1993. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Avila-Diaz, I., Oyama, E.K., Gomez-Alonso, E.C. dan Salgado, R. 2009. "In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*". *Plant Cell Tiss. Organ Cult*, 99. 335-343
- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2007. *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis: Rangkuman Kebutuhan Investasi . Edisi Kedua*. Departemen Pertanian Republik Indonesia, Jakarta.
- Dan, Y. 2008. "Biological functions of antioxidants in plant transformation". *In Vitro Cell.Dev.Biol,-Plant*, 44. 149-161
- Desai, N. and I G. W. Chism. 2006. "Changes in cytokinin activity in the ripening tomato fruit". *Journal of Food Science*, 43. 1324 - 1326
- Dodd, B. 1993. *Plant tissue culture for horticulture*. Queensland University of Technology, Queensland.
- Dodds, J.H. and Roberts, L.W. 1995. *Experiments in plant tissue culture, 3rd rev. ed.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Dutta, S, Chowdhury, A., Bhaaacharjee, B., Nath, P.K. dan Dutta, B.K. 2011. "In vitro multiplication and protocorm development of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) CEC Fisher". *Biological and Environmental Sci*, 7. 57-62
- Dwiyani, R., Purwantoro, A., Indrianto, A., dan Semiarti, E. 2009. Peningkatan kecepatan pertumbuhan embrio anggrek *Vanda tricolor* Lindl. pada medium diperkaya dengan ekstrak tomat. *Prosiding Seminar Biologi Nasional XX*. UIN-Malang, 24-25 Juli 2009. 590-596
- Gardiner, L.M. 2007. "*Vanda tricolor* Lindl. Conservation in Java, Indonesia: Genetic and Geographic Structure and History". *Lankesteriana*, 7. 272-280.
- George, E.F. and Sherrington, P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture. Hand book and directory of commercial laboratories*. Exegetics Ltd, England.
- Irawati. 2002. "Pelestarian jenis anggrek Indonesia". *Buku panduan Seminar Anggrek Indonesia 2002*. 34-45
- Islam, MO., Ichihasi, S., Matsui, S. 1998. "Control of growth and development of protocorm like body derived from callus by carbon sources in *Phalaenopsis*". *Plant Biotechnol*, 15. 183-187
- Lo S-F, Nalawade SM, CL Kuo, CL Chen, dan Tsay HS. 2004. "Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino-a medicinally important orchid". *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* , 40. 528-535
- Neumann, K-H., Kumar, A., dan Imani, J. 2009. *Plant Cell and Tissue Culture- A Tool in Biotechnology, Basics and Application*. Springer-Verlag, Berlin.
- Santos-Herna'ndez L, Mart'ınez-Garc'ıa M, Campos JE, dan Aguirre-Leo'n E. 2005. "In vitro propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico". *Hortic. Sci.*, 40. 439-442
- Semiarti, E., Ari Indrianto, A. Purwantoro, S. Isminingsih, N. Suseno, T. Ishikawa, Y. Yoshioka, Y. Machida, dan C. Machida. 2007. "Agrobacterium-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*". *Plant Biotechnol.*, 24. 265-272
- Stewart, S.L., dan Kane, M.E. 2006. "Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid". *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 86. 147-158