

---

**JURNAL METAMORFOSA**  
*Journal of Biological Sciences*  
ISSN: 2302-5697  
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

---

**PENYELAMATAN EMBRIO *Dendrobium anosmum* Lindl. MELALUI KULTUR *IN VITRO***

**EMBRYO RESCUE *Dendrobium anosmum* Lindl. USING *IN VITRO* CULTURE**

**Putu Yuni Astriani Dewi\*, Ida Ayu Astarini, Eniek Kriswiyanti**

*Program Studi Magister Ilmu Biologi Program Pascasarjana, Universitas Udayana*

*Jl. P.B. Sudirman, Denpasar-Bali 80232*

*\*Email: yuniastriani@ymail.com*

**INTISARI**

Penelitian bertujuan menganalisis persentase perkecambahan, pengaruh penambahan air kelapa pada media kultur terhadap jumlah embrio tahap akhir serta tahapan perkembangan embrio tahap akhir pada *D. anosmum* Lindl. Penelitian dilakukan di Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana dan di UPT. Balai Benih Induk Tanaman Pangan dan Hortikultura Provinsi Bali pada bulan Februari 2015 hingga Juli 2015. Tiga macam media dasar digunakan yaitu PDA, Organik, dan MS dengan tiga konsentrasi air kelapa sebanyak 0 ml/L, 50 ml/L dan 100 ml/L. Hasil penelitian menunjukkan bahwa benih *D. anosmum* Lindl. pada media PDA, Organik dan MS belum berkecambah namun pembesaran sel dapat teramati. Dormansi dan kematangan benih menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi perkecambahan benih. Penambahan air kelapa sebanyak 100 ml/L pada MS menunjukkan bahwa media tersebut mampu meningkatkan jumlah embrio tahap akhir yang terbentuk (> 32 sel). Tahapan perkembangan embrio pada media PDA dan Organik sebagian besar menunjukkan embrio tahap 1 sel hingga 8 sel, sedangkan pada media MS sudah menunjukkan perkembangan embrio tahap > 32 sel.

*Kata kunci: Kultur Jaringan Tanaman, Anggrek, Perkecambahan, Murashige and Skoog, Perkembangan Embrio, Proembrio.*

**ABSTRACT**

The aim of the research is to analyse germination percentage, effect of coconut water addition in the media to number of last stage embryos and development of final stage *D. anosmum* Lindl. embryo. Research was conducted at Plant Structure and Development of Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences University of Udayana and UPT. Balai Benih Induk Tanaman Pangan dan Hortikultura Provinsi Bali from February 2015 to July 2015. Three type of media were employed, i.e. PDA, Organic, MS. Three different concentration of coconut was added to media, i.e. 0 ml/L 50 ml/L, 100 ml/L. Results showed that seed *D. anosmum* Lindl. on PDA, Organic and MS has not germinated yet on all media, only swollen cells observed. Seed dormancy and maturity of seed were the main factors affecting seed germination. Addition of 100 ml / L coconut water in MS showed that media is capable to increase the formation of final stages embryos (> 32 cells). Embryo development on PDA and Organic largely showed cell stage embryos 1 to 8 cells, while MS media already showed embryo development stages of > 32 cells.

*Keywords: Plant Tissue Culture, Orchid, Germination, Murashige and Skoog, Embryo Growth, Proembryo.*

## PENDAHULUAN

*Dendrobium anosmum* Lindl. merupakan salah satu anggrek epifit yang tumbuh secara alami di daratan Asia yaitu Thailand, India, Sri Lanka, Laos, Vietnam, Filipina, Malaysia, Indonesia, dan Papua New Guinea (Tuhuteru dkk., 2012). *D. anosmum* Lindl. dapat dijumpai di Indonesia seperti kawasan hutan tropis di Pegunungan Wilis dan Lereng Lawu Selatan (Yulia, 2010).

Beberapa jenis anggrek mengalami penurunan populasi yang disebabkan adanya eksploitasi anggrek yang tidak terkontrol, kerusakan habitat akibat kebakaran hutan dan tanah longsor (Lisnandar dkk., 2012). Pemanfaatan kawasan untuk pembukaan jalan baru di habitat aslinya juga merupakan salah satu penyebab populasi termasuk anggrek *D. anosmum* Lindl. semakin menurun.

Kegiatan perbanyak *D. anosmum* Lindl. sangat penting dilakukan mengingat habitat tidak mendukung lagi hidup anggrek tersebut. Salah satu upaya dalam melakukan konservasi terhadap *D. anosmum* Lindl. adalah dengan melakukan perbanyak secara massal di laboratorium (konservasi *ex-situ*). Konservasi *ex-situ* pada *D. anosmum* Lindl. dapat dilakukan dengan menggunakan teknik kultur jaringan.

Pada teknik kultur jaringan penggunaan zat pengatur tumbuh memiliki peranan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman, seperti pembesaran sel, pada aktivitas sel kambium, pertumbuhan akar, pada pembentukan tunas adventif, dan proliferasi tunas aksilar, serta pembentukan akar (Pramanik dan Rachmawati, 2010). Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai zat pengatur tumbuh adalah air kelapa.

Air kelapa digunakan sebagai bahan organik adalah cara untuk menggantikan bahan sintesis yang digunakan untuk membuat media kultur, antara lain Kinetin. Kelapa yang digunakan adalah kelapa yang berumur 7-8 bulan ( $\pm$  210 hari) (Kristina dan Sitti, 2012). Tuhuteru dkk. (2012) telah melakukan penelitian dari eksplan *D. anosmum* Lindl. yang memiliki tinggi 2–4 cm.

Udomdee *et al.* (2014) telah melakukan penelitian mengenai perkecambahan benih

*Dendrobium nobile* dari hasil silangan dengan menggunakan media dasar Murashige and Skoog (MS) dan konsentrasi gula yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media MS dengan konsentrasi gula 10 g/L mampu memacu perkecambahan secara optimal.

Sejauh ini belum ditemukan penyelamatan embrio pada *D. anosmum* Lindl. dengan menggunakan media MS, PDA dan media organik dengan penambahan konsentrasi air kelapa dalam perkecambahan benih anggrek ini. Maka perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan ketiga media tersebut untuk mengetahui pengaruh media terhadap perkecambahan benih dan tahapan perkembangan pertumbuhan anggrek *D. anosmum* Lindl. sebagai upaya dalam melakukan konservasi terhadap anggrek spesies di Indonesia.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dimulai Bulan Februari 2015 hingga Juli 2015 di Laboratorium Kultur Jaringan Anggrek UPT. Balai Benih Induk Tanaman Pangan dan Hortikultura Desa Luwus, Kecamatan Baturiti, Kabupaten Tabanan Provinsi Bali dan di Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana. Sampel buah anggrek diambil dari Kebun Raya Eka Karya Bali.

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah buah anggrek *D. anosmum* Lindl. yang berumur 5 bulan. Bahan-bahan yang digunakan pada kultur benih anggrek yaitu agar, pisang ambon, gula pasir, air kelapa, kentang, tomat, media MS, dan media organik.

#### ➤ Persiapan Air Kelapa

Air kelapa diambil dari buah kelapa dipilih daging buah tidak begitu lunak, namun juga tidak terlalu keras (usia 210–240 hari). Air kelapa disaring kemudian dipanaskan sampai mendidih, kemudian digunakan dalam pembuatan media (air kelapa ditambahkan saat media dipanaskan) (Tuhuteru dkk., 2012).

#### ➤ Bahan-bahan Media Organik

Media organik menggunakan bahan-bahan seperti gula (20 gr/L), agar (8 gr/L), arang (2

gr/L), vitamin C (100 mg/L), pisang ambon (150 gr/L), sari kentang (250 ml/L), Gandasil (4 gr/L) (Shintiavira dkk., 2014), *aquadest*, HCl, dan air kelapa.

➤ **Bahan-bahan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)**

Media PDA menggunakan bahan-bahan seperti gula (20 gr/L), agar (8 gr/L), fish emulsion (3 ml/L), sari kentang (250 ml/L), Gandasil (4 gr/L) (Shintiavira dkk., 2014), *aquadest*, HCl, dan air kelapa.

➤ **Bahan-bahan Media *Murashige and Skoog* (MS)**

Media MS menggunakan bahan-bahan seperti media MS instan (4,43 g/L), gula (20 g/L), agar (8 g/L), tomat (100 g/L), *aquadest*, HCl, dan air kelapa.

**Cara Pembuatan Preparat**

Embrio difiksasi dalam 10% Buffered formalin, Infiltrasi dengan *paraffin*. Penyayatan dengan ketebalan 2-3 µm menggunakan mikrotom putar. Pewarnaan dengan 0,5% Hematoxiline-eosin dalam *aquadest* selama 24

jam. Preparat diamati di bawah mikroskop (Luna, 1968).

**Sterilisasi Kapsul *Dendrobium Anosmum Lindl.***

Kapsul anggrek disterilkan terlebih dahulu dengan merendam kapsul ke dalam alkohol 70% selama 3 menit dan 0,6% *Sodium hypochlorite* selama 10 menit. Kemudian kapsul di cuci bersih dengan air steril sebanyak 3 kali lalu dimasukkan ke dalam alkohol 95% selama 15 detik dan dipanaskan dengan api bunsen selama 2-3 detik (Udomdee *et al.*, 2014).

Penelitian ini dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial 2 faktor. Faktor pertama adalah zat pengatur tumbuh air kelapa yang terdiri dari 3 konsentrasi yaitu 0 (kontrol), 50 ml/L, dan 100 ml/L. Faktor kedua yaitu 3 macam media yaitu media organik, PDA, dan MS. Diperoleh 9 kombinasi perlakuan dan setiap kombinasi diulang sebanyak 4 kali sehingga terdapat 36 unit percobaan (Tabel 1).

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Air Kelapa dan Media Kultur pada Benih Anggrek *D. anosmum Lindl.*

		F1	Media Kultur		
			Mo	MS	PDA
Air kelapa	(K) 0	MoK0	MSK0	PDK0	
	(K1) 50 ml/L	MoK1	MSK1	PDK1	
	(K2) 100 ml/L	MoK2	MSK2	PDK2	

Keterangan :

F1 = Faktor pertama, F2 = Faktor kedua, K0 = Perlakuan kontrol, K1 = Perlakuan dengan pemberian 50 ml/L air kelapa ke masing-masing media, K2 = Perlakuan dengan pemberian 100 ml/L air kelapa ke masing-masing media, Mo = Media organik, MS = *Murashige and Skoog*, PDA = *Potato Dextrose Agar*

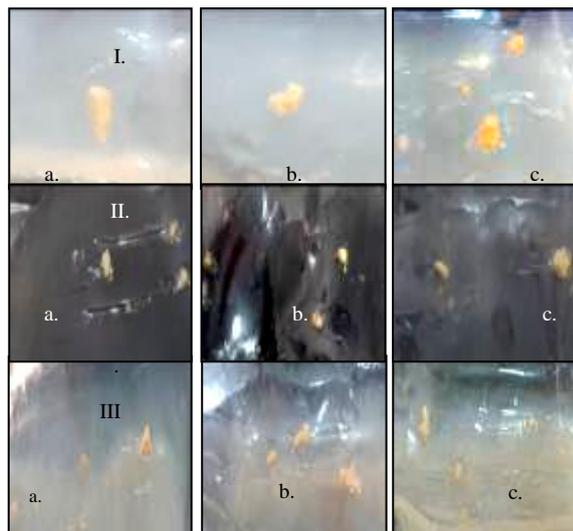
**Analisis Data**

Data kuantitatif penelitian ini dianalisis dengan analisis sidik ragam atau ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan *software SPSS for Windows* versi 16.0 pada taraf nyata ( $\alpha$ ) < 0,05 dilanjutkan uji Duncan (Priyatno 2012).

**HASIL**

**Persentase Perkecambahan Benih Anggrek *Dendrobium anosmum Lindl.* pada Media MS, Media Organik dan Media PDA**

Hasil penelitian perkecambahan benih anggrek *Dendrobium anosmum Lindl.* pada media MS, media Organik dan media PDA umur 4, 8, dan 12 Minggu Setelah Tanam (MST) menunjukkan belum terjadi perkecambahan, hanya pembengkakan sel. Perlakuan tanpa atau pemberian air kelapa sebanyak 50 ml/L, dan 100 ml/L tidak menunjukkan perubahan warna maupun kemunculan tunas (Gambar 1).



Gambar 1. Pertumbuhan Benih *D.anosmum* Lindl. Umur 12 MST

Keterangan : I = Media PDA, II : Media Organik, III = Media MS a. K0 (Tanpa pemberian air kelapa) b. K1(Pemberian air kelapa 50 ml/L) c. K2 (Pemberian air kelapa 100 ml/L)

Tabel 2. Diameter Biji dan Kantong Embrio *D. anosmum* Lindl. di masing-masing perlakuan media pada minggu ke-12

No	Perlakuan	Diameter (µm)	
		Biji	Kantong Embrio
1	Kontrol	5.92 a	2.96 a
2	PDK0	22.58 b	11.42 bc
3	PDK1	24.39 bc	12.28 bc
4	PDK2	27.90 d	13.10 bc
5	MOK0	27.57 cd	12.78 bc
6	MOK1	22.92 b	12.37 bc
7	MOK2	22.96 b	12.17 bc
8	MSK0	22.31 b	13.25 bc
9	MSK1	20.66 b	11.26 b
10	MSK2	23.84 bc	13.41 c

Keterangan :

K0 = Perlakuan kontrol (sebelum ditanam dalam media kultur), K1 = Perlakuan dengan pemberian 50 ml/L air kelapa ke masing-masing media, K2 = Perlakuan dengan pemberian 100 ml/L air kelapa ke masing-masing media, Mo = Media organik, MS = *Murashige and Skoog*, PDA = *Potato Dextrose Agar*.

**Pengaruh Penambahan Air Kelapa dengan Konsentrasi yang Berbeda pada Media PDA, Organik dan MS Terhadap Jumlah Embrio *D. anosmum* Lindl Tahap Akhir yang Terbentuk (≥ 32 sel).**

Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa pengaruh penambahan air kelapa berbeda nyata pada tiga media terhadap jumlah embrio tahap akhir yang terbentuk. Penambahan air kelapa

berpengaruh nyata terhadap jumlah embrio tahap akhir yang terbentuk. Hal ini dapat dilihat dari F hitung lebih besar dari 0,05. Hasil penelitian menunjukkan jumlah embrio tahap akhir tertinggi pada penambahan air kelapa sebanyak 100 ml/L pada media MS berpengaruh terhadap jumlah embrio tahap akhir yang terbentuk yaitu embrio tahap ≥ 32 sel (Tabel 3).

Tabel 3. Pengaruh Penambahan Air Kelapa pada Tiga Media terhadap Jumlah Embrio Tahap Akhir ( $\geq 32$  sel ) yang Terbentuk pada 12 MST

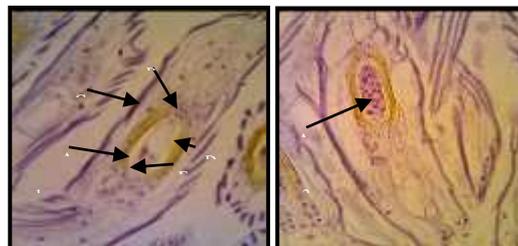
No.	Perlakuan	Jumlah embrio tahap akhir
1.	Kontrol	0,37 a
2.	PDK0	5,37 b
3.	PDK1	8,33 bc
4.	PDK2	6,73 b
5.	MOK0	8,57 bc
6.	MOK1	8,87 bc
7.	MOK2	9,00 bc
8.	MSK0	11,57 c
9.	MSK1	20,70 d
10.	MSK2	24,40 e

Keterangan : Kontrol = Sebelum ditanam dalam media kultur, K0 = Perlakuan kontrol, K1 = Perlakuan dengan pemberian 50 ml/L air kelapa ke masing-masing media, K2 = Perlakuan dengan pemberian 100 ml/L air kelapa ke masing-masing media, Mo = Media organik, MS = *Murashige and Skoog*, PDA = *Potato Dextrose Agar*

### Tahapan Perkembangan Embrio *D. anosmum* Lind. Pada Media MS, Organik dan PDA

Hasil penelitian tahapan perkembangan embrio dapat dilihat pada Gambar 2. Gambar 3 menunjukkan persentase tahapan perkembangan embrio hingga minggu ke-12 pada kontrol (sebelum ditanam dalam media kultur) maupun media PDK0 hingga MOK2 masih banyak

ditemui proembrio tahap 1 sel bila dibandingkan dengan tahapan perkembangan embrio pada media MSK0-K2. Persentase perkembangan embrio tahap 32 sel terlihat meningkat pada media MSK1 dan MSK2.

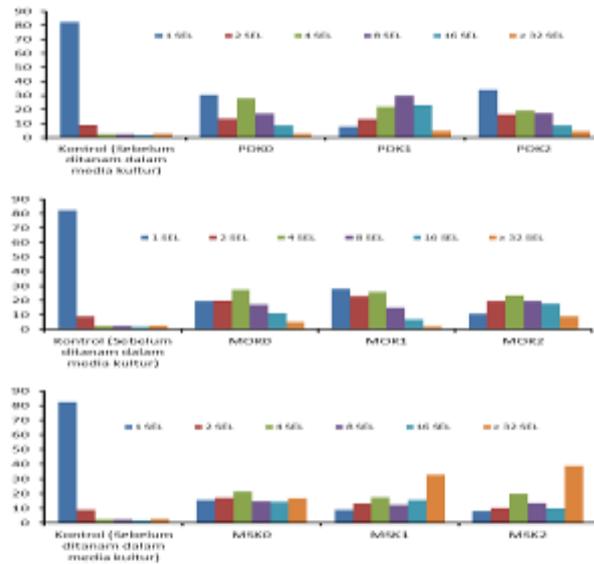


Gambar 2. Posisi/ Letak Bakal Biji/ Biji

Keterangan : 1A. mikropi, B. Kalaza, C. Kulit biji, D. Kantong embrio, E. Integumen. 2A. Embrio (Perbesaran 400x)

Gambar 4 menunjukkan hasil pembuatan preparat dari eksplan benih *D. anosmum* Lindl. dalam media kultur. Hasil sayatan menunjukkan bahwa tingkat perkembangan embrio *D. anosmum* Lindl. lambat dengan ditemui adanya proembrio tahap uniseluler (Gambar 4). Sebagian besar proembrio tahap uniseluler hingga 8 sel ditemukan pada media PDA dan Organik baik

dengan penambahan air kelapa maupun tanpa penambahan air kelapa sebanyak 50 ml/L dan 100 ml/L. Pada media MS baik tanpa penambahan air kelapa maupun dengan penambahan air kelapa sebanyak 50 ml/L dan 100 ml/L dapat ditemukan embrio tahap  $\geq 32$  sel.



Gambar 3. Persentase Tahapan Perkembangan Embrio pada Media PDA (A), MO (B), dan MS (C) pada minggu ke-12. Keterangan: a. Kontrol (Sebelum ditanam dalam media kultur), b. K0= Media tanpa pemberian air kelapa, c. K1 = Media dengan pemberian air kelapa 50 ml/L, d. K2 = Media dengan pemberian air kelapa 100 ml/L

**PEMBAHASAN**

**Persentase Perkecambahan Benih Anggrek *Dendrobium anosmum* Lindl. pada Media MS, Media Organik dan Media PDA**

Perkecambahan benih anggrek dimulai dengan pembengkakan benih, diikuti kemunculan radikula dari testa, sampai terlepasnya embrio dari testa dalam media kultur (Dwiyani, 2013). Hasil penelitian menunjukkan belum adanya tanda perkecambahan pada media perlakuan hingga minggu ke-12 (Gambar 1).

Perkecambahan benih anggrek dalam media kultur dapat dilihat dengan adanya pertumbuhan *Protocorm Likes Bodies* (PLB) yang berwarna pada usia tertentu tergantung dari jenis benih anggrek yang ditanam dalam media kultur. Tidak adanya perkecambahan pada benih *Dendrobium anosmum* Lindl. dipengaruhi oleh beberapa faktor baik faktor internal dan faktor eksternal.

Faktor internal yang mempengaruhi perkecambahan benih adalah dormansi benih. Hal ini dapat dilihat pada benih *D. anosmum* Lindl. dalam media perlakuan hingga berumur 12 MST yang tidak mengalami perkecambahan namun belum menunjukkan adanya kematian. Menurut Dwiyani (2013), dormansi benih adalah ketidakmampuan benih hidup untuk berkecambah

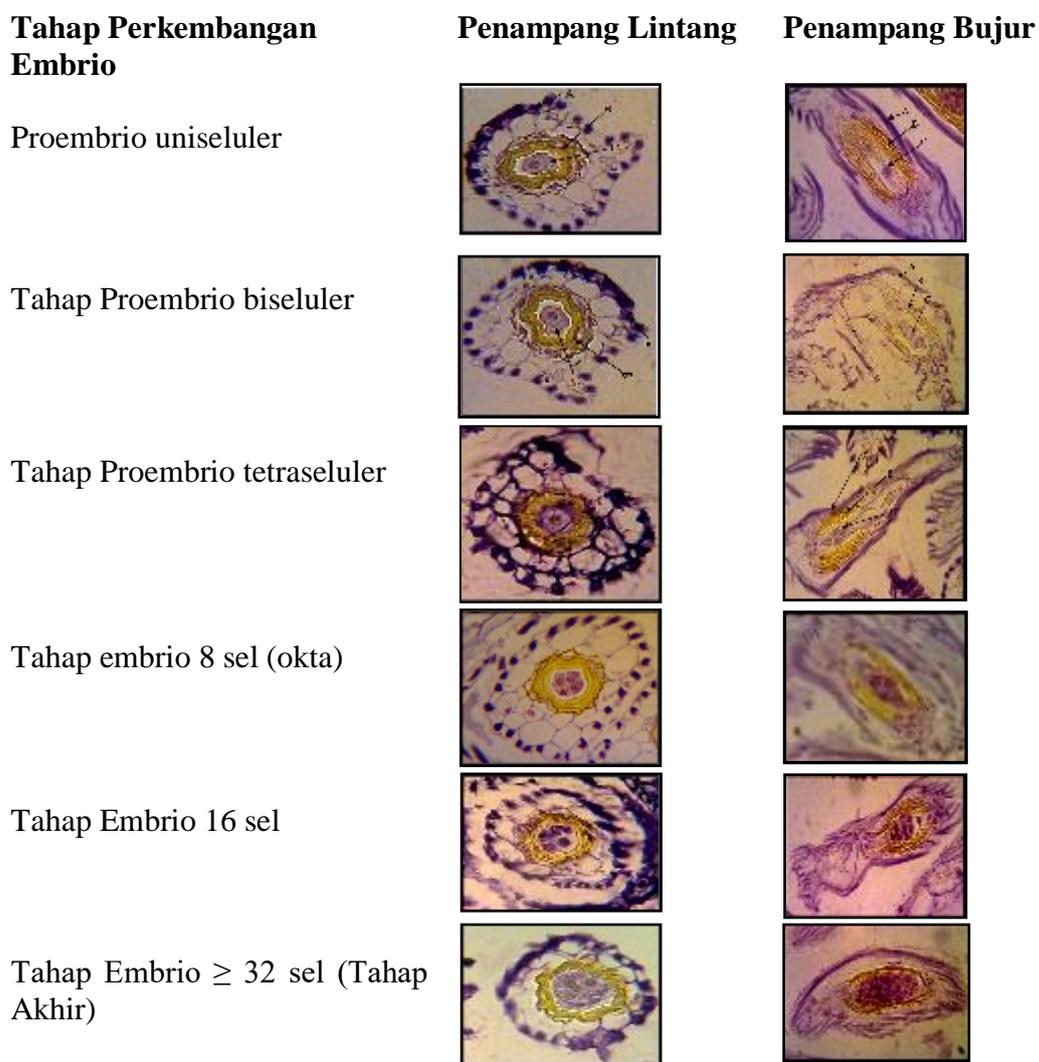
pada lingkungan yang optimum. Dormansi dapat disebabkan oleh keadaan fisik dari kulit biji, keadaan fisiologis dari embrio atau kombinasi dari kedua keadaan tersebut. Namun demikian dormansi bukan berarti benih tersebut mati atau tidak dapat tumbuh kembali.

Pengaruh dormansi benih juga disebabkan oleh belum hilangnya suberin dalam benih *D. anosmum* Lindl. sehingga perlu dilakukan pematangan dormansi benih. Menurut Kurnianti (2011), untuk menghilangkan suberin pada bagian integumen benih *D. capra* dilakukan perendaman dengan menggunakan Larutan *hypoclorit* (NaOCl) selama ± 2 menit sehingga benih mampu mengalami difusi dan permeabel terhadap air. Suberin adalah zat lilin yang berfungsi sebagai pelindung benih anggrek dari proses pematangan dormansi. Hilangnya suberin menyebabkan testa biji menipis dan mengalami imbibisi (Ramsay dan Dixon, 2003).

Faktor internal yang mempengaruhi perkecambahan benih juga dipengaruhi oleh tingkat kemasakan buah, ukuran buah (Claudia *et al.*, 2013). Disamping itu faktor viabilitas dan jangka waktu benih dapat hidup juga berpengaruh terhadap kemampuan biji untuk berkecambah (Udomdee *et al.*, 2014).

Perkembangan embrio *Dendrobium anosmum* Lindl. yang masih lambat juga dapat dilihat dari pengukuran diameter kantong embrio di masing-masing perlakuan media (Tabel 2). Perbandingan ukuran kantong embrio sebelum ditanam dalam media kultur dengan setelah ditanam dalam media kultur secara umum mengalami penambahan ukuran. Peningkatan ukuran diameter kantong embrio dipengaruhi oleh adanya media baik PDA, Organik maupun media MS serta adanya penambahan air kelapa sebanyak 50 ml/L dan 100 ml/L. Media kultur

memiliki pengaruh untuk merangsang pertumbuhan embrio. Namun perbandingan setelah ditanam dalam media kultur yang berumur 4 MST hingga 12 MST sebagian besar tidak mengalami peningkatan atau konstan. Hal ini didukung dengan perkecambahan padi bahwa perkembangan embrio dalam media kultur juga dipengaruhi oleh penambahan zat pengatur tumbuh yang mampu merangsang perkembangan dan pertumbuhan embrio selanjutnya (Sinambela, 2008).



Gambar 4. Irisan Lintang dan Bujur Tahap Perkembangan Embrio (Perbesaran 400x)  
Keterangan : a. Kulit biji, b. Kantong embrio, c. Embrio

### **Pengaruh Penambahan Air Kelapa dengan Konsentrasi yang Berbeda pada Media PDA, Organik dan MS Terhadap Jumlah Embrio *D. anosmum* Lindl $\geq 32$ sel yang Terbentuk**

Pengaruh penambahan air kelapa dengan konsentrasi 50 ml/L dan 100 ml/L pada media PDA, Organik dan MS perkecambahan benih *D. anosmum* Lindl. karena kalus tidak terbentuk. Namun, pengamatan secara mikroskopis dari preparat biji *D. anosmum* Lindl. yang sudah ditanam, melalui hasil ANOVA bahwa kontrol dengan penambahan air kelapa dengan konsentrasi berbeda pada masing-masing media Organik dan MS berpengaruh nyata terhadap jumlah embrio  $\geq 32$  sel yang ditemui. Pada umur 12 MST di masing-masing perlakuan media terutama media PDA dan organik dengan penambahan air kelapa masih sedikit ditemukan embrio tahap akhir sedangkan jumlah embrio  $\geq 32$  sel lebih banyak ditemui pada media MS dengan penambahan air kelapa sebanyak 50 ml/L dan 100 ml/L.

Air kelapa baik digunakan pada media kultur jaringan karena mengandung bahan-bahan seperti vitamin, mineral, asam amino dan asam nukleat, fosfor serta zat tumbuh auksin dan giberelin yang berfungsi sebagai stimulator proliferasi jaringan, memperlancar metabolisme dan respirasi (Sari *et al.*, 2011; Husain, 2012). Menurut Semiarti *et al.* (2010), air kelapa dapat digunakan sebagai pengganti hormon sitokinin. Pada tingkat konsentrasi tertentu air kelapa dapat menginisiasi terbentuknya tunas. Penambahan air kelapa dengan konsentrasi 100 ml/L adalah efektif meningkatkan jumlah embrio  $\geq 32$  sel. Hal ini dilihat dari jumlah embrio  $\geq 32$  sel pada media MS 12 MST apabila dibandingkan dengan media PDA dan Organik yang ditambahkan air kelapa. Ini diduga karena kandungan sitokinin dalam media perlakuan dengan konsentrasi tersebut lebih tinggi sehingga memperlihatkan adanya pembelahan sel.

Air kelapa dengan konsentrasi 100 ml/L dalam media MS merupakan konsentrasi optimal dalam menghasilkan jumlah embrio  $\geq 32$  sel yang terbentuk. Hal ini didukung oleh penelitian Tuhuteru *et al.* (2012), di dalam air kelapa terdapat kandungan sitokinin sehingga proses

pembelahan sel terjadi secara terus menerus. Kandungan sitokinin dalam air kelapa (100 ml/L) tersebut mempengaruhi asam nukleat sehingga berpengaruh terhadap sintesa protein dan pengatur aktivitas enzim dalam hal pembelahan sel pada embrio *D. anosmum* Lindl.

Media perlakuan juga ada media organik yang ditambahkan arang aktif atau *charcoal*. Walaupun penelitian ini jumlah embrio  $\geq 32$  sel yang terbentuk hanya sedikit dijumpai dalam Media Organik, namun arang yang ditambahkan dalam Media Organik ini berguna untuk menyerap racun atau senyawa inhibitor yang disekresikan oleh plantlet ke dalam media. Disamping itu, arang aktif dapat mengurangi pencoklatan media akibat pemanasan tinggi setelah sterilisasi (Vogel *et al.*, 2011).

Menurut Chyuam-Yih *et al.* (2011), penambahan arang aktif proanalisis sebanyak 2 g/L ke dalam media kultur dapat meningkatkan pertumbuhan benih. Namun demikian, semua bahan-bahan nutrisi baik yang berasal dari senyawa anorganik maupun senyawa organik tersebut, tingkat penyerapannya oleh bahan tanaman sangat dipengaruhi oleh pH media itu sendiri. Untuk pertumbuhan, pH yang sesuai adalah 5.0–6.5 sedangkan bila pH terlalu tinggi ( $>7.0$ ) dapat menghambat atau bahkan menghentikan pertumbuhan dan perkembangan kultur secara *in vitro* (Vogel *et al.*, 2011).

Penelitian juga menggunakan media sederhana yaitu *Potato Dextrose Agar*/ PDA. namun tidak menunjukkan perubahan pada jumlah embrio  $\geq 32$  sel *D. anosmum* Lindl. dan benih pada media tersebut tidak mengalami kematian. Menurut Widiastoety (2001), di dalam media kultur jaringan, bahan organik merupakan salah satu faktor penting pada media dikarenakan setiap bahan-bahan organik terdapat sumber-sumber zat pengatur tumbuh, asam nukleat, asam amino serta unsur hara tambahan yang diduga diperlukan oleh tanaman baik dalam pertumbuhan maupun perkembangan tanaman tersebut.

Pertumbuhan dan perkembangan embrio  $\geq 32$  sel yang terbentuk pada media MS lebih baik secara kualitatif jika dibandingkan dengan media lain yakni PDA dan Organik. Hal ini dapat disebabkan karena kandungan unsur hara makro

dan mikro pada media ini lebih kompleks jika dibandingkan dengan media lainnya. Menurut Chyuam-Yih *et al.* (2011), media MS adalah media yang kaya akan unsur nitrogen dalam proses pembelahan dan pembesaran sel maupun penyusunan asam amino.

### **Tahapan Perkembangan Embrio *D. anosmum* Lindl. Pada Media MS, Organik dan PDA**

Gambar 2 menunjukkan letak bakal biji/ biji dalam tembuni/ plasenta yang memperlihatkan kedudukan biji yang tegak. Menurut Tjitrosoepomo (2013), kedudukan bakal biji/ biji yang demikian disebut dengan *atropus/ orthotropus*. Letak bakal biji dikatakan *atropus/ orthotropus* apabila liang bakal biji terletak pada satu garis dengan funikulus dengan arah yang berlawanan. Dilihat dari gambar tersebut *D. anosmum* Lindl. memiliki dua integumen. Menurut Wijayani *et al.* (2007) sebagian besar tanaman berbiji tertutup misalnya pada anggrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl memiliki 2 integumen yaitu integumen luar dan integumen dalam.

Tahapan perkembangan embrio *D. anosmum* Lindl. pada masing-masing perlakuan media dari umur 4 MST hingga 12 MST menunjukkan tingkat perkembangan embrio yang masih lambat. Banyak ditemui embrio tahap 1 sel hingga 8 sel pada media PDA dan Organik baik dengan penambahan air kelapa sebanyak 50 ml/L dan 100 ml/ L.

Pengamatan terhadap irisan lintang dan bujur proembrio tahap uniseluler (Gambar 4) memperlihatkan lapisan kantong embrio yang masih tebal. Di dalam kantong embrio terdapat embrio yang memiliki 1 sel. Embrio tahap 1 sel merupakan tahapan awal dalam perkembangan embrio, karena setelah terjadinya pembuahan, sel telur yang telah dibuahi (zigot) akan membelah secara transversal yang salah satu bagian selnya akan berkembang menjadi embrio yang masih memiliki 1 sel (Mulyani, 2006). Sel lainnya disebut sel basal yang berasal dari sel tunggal memiliki suatu struktur yang menyerupai suspensor dan sudah ditentukan sejak pembelahan awal. Hal ini didukung dengan perkembangan embrio somatik *Pennisetum americanum* yang mempunyai struktur menyerupai suspensor sebagai

penghubung antara embrio dengan *endosperm*. Fungsi suspensor terutama pada tahap awal embriogenesis adalah untuk transpor nutrisi bagi embrio (Bhojwani and Bhatnagar, 1999).

Embrio *D. anosmum* Lindl. selanjutnya akan berkembang dan mengalami pembelahan sel. Gambar 4 dengan irisan lintang maupun bujur menunjukkan perbedaan jumlah sel dari embrio *D. anosmum* Lindl. Sel-sel di sekitar embrio masih bersifat meristematis tersusun dari sel-sel berukuran kecil, mempunyai inti yang jelas, sitoplasma padat, menyerap warna kuat, serta memiliki regenerasi yang tinggi. Perkembangan seperti ini dilaporkan juga terjadi pada *Phalaenopsis amabilis* (L.) (Utami *et al.*, 2007) sel-sel embriogenik selanjutnya membentuk kelompok/kluster sel-sel embriogenik dan diikuti pembelahan dengan arah transversal terhadap aksis panjang embrio sehingga dihasilkan proembrio 2 sel yang tidak sama besar, sel apikal (kecil) dan sel basal (lebih besar). Pola perkembangan embrio seperti ini terjadi pada kebanyakan embrio zigotik anggrek (Chaundary *et al.*, 2012).

Selanjutnya terjadi pembelahan secara cepat menghasilkan proembrio 2 sel hingga 16 sel dan terjadi diferensiasi pada embrio tersebut. Bagian apikal embrio tersusun oleh sel-sel yang berukuran kecil dan aktif mengadakan pembelahan, sedangkan di bagian basal sel-selnya hanya membesar dan di bagian luarnya terdiri atas selapis sel yang tersusun teratur. Keadaan ini dapat disebabkan karena dalam media terkandung sitokinin yang berupa air kelapa yang mampu menginduksi pembentukan embrioid secara langsung dan berperan dalam memacu pembelahan sel (Wijayani *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil pengamatan pada embrio anggrek *D. anosmum* Lindl. ditemukan adanya pembelahan sel yang mirip dengan pembelahan sel pada embrio *Najas lacerata*. Menurut Bhojwani and Bhatnagar (1999), pembelahan sel embrio pada *Najas lacerata* yang sudah mengalami pembelahan lebih dari 32 sel (globuler) akan membentuk jaringan meristem. Jaringan meristem primer ini dapat dilihat adanya perubahan bentuk seperti hati. Jaringan meristem ini terdiri dari tiga bagian, yaitu protoderm (calon epidermis), meristem dasar (akan membentuk

jaringan dasar), dan prokambium (akan membentuk jaringan pengangkut), embrio memanjang, dan akan membentuk embrio yang lengkap dan mulai terlihat adanya perkecambahan.

## KESIMPULAN

Benih *D. anosmum* Lindl. tidak menunjukkan terjadinya perkecambahan pada media PDA, Organik dan MS. Penambahan air kelapa sebanyak 100 ml/L pada media MS mampu meningkatkan jumlah embrio tahap akhir yang terbentuk ( $\geq 32$  sel). Tahapan perkembangan embrio pada media PDA dan Organik sebagian besar menunjukkan embrio tahap 1 sel hingga 8 sel, sedangkan pada media MS sudah menunjukkan adanya perkembangan embrio tahap  $> 32$  sel.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada UPT. Balai Benih Induk Tanaman Pangan dan Hortikultura, Balai Besar Veteriner Kota Denpasar atas fasilitas yang telah diberikan selama penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani, S.S. and S.P. Bhatnagar. 1999. *The Embryology of Angiosperm. Fourth Revised Edition*. Delhi: Vikas Publishing House. PVT. LTD.
- Chaudhary, B., C. Pritam, V. Neetu and B. Nirmalya. 2012. Understanding the Phylomorphological Implications of Pollinia from *Dendrobium* (Orchidaceae). India: *American Journal of Plant Sciences* 3: 816-828.
- Chyuam-Yih Ng., and M. S. Norihan 2011. In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 105:193–202.
- Claudia, V., I.A. Astarini dan S.K. Sudirga. 2013. Uji Viabilitas Benih Anggrek Hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) Dengan Masa Simpan Yang Berbeda. Bali. *Symbiosis* I (2): 79-84.
- Dwiyani, R. 2013. Perkecambahan Biji dan Pertumbuhan Protokorm Anggrek dari Buah dengan Umur yang Berbeda pada Media Kultur yang Diperkaya dengan Ekstrak Tomat. Bali. *Jurnal Hortikultura Indonesia* 4(2):90-93.
- Husain, I. 2012. Induksi Protocorm pada Eksplan Bawang Putih pada Media MS Minim Hara Makro dan Mikro yang Ditambahkan Air Kelapa. *Journal Agroteknotropika* 1 (1):28-32.
- Kristina, N. N dan F.S. Sitti. 2012. Pengaruh Air Kelapa Terhadap Multiplikasi Tunas *In Vitro*, Produksi Rimpang, Dan Kandungan Xanthorrhizol Temulawak Di Lapangan. Bogor. *Jurnal Littri* 18(3): 125-134.
- Kurnianti, L. F. 2011. Pengaruh Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Naa Dan Bap Terhadap Pertumbuhan Biji *Dendrobium capra* J.J. Smith Secara *In Vitro*. Surabaya : Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Lisnandar, D. S., M. Widya dan P. Ari. 2012. Pengaruh pemberian variasi konsentrasi NAA ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid) dan 2.4 D terhadap induksi *protocorm like bodies* (PLB) anggrek macan (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.)). Surakarta : *Bioteknologi* 9 (2): 66-72.
- Luna, L. G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. London: McGraw-Hill Book Company.
- Mulyani, S. 2006. *Anatomi Tumbuhan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius (Anggota IKAPI).
- Pramanik, D. dan F. Rachmawati. 2010. Pengaruh Jenis Media Kultur *In Vitro* dan Jenis eksplan terhadap Morfogenesis Lili Oriental. Cianjur: *Jurnal Hortikultura* 20 (2) : 111-119.
- Priyatno, D. 2012. *Cara Kilat Belajar Analisis Data dengan SPSS 20*. Cetakan Kedua. Yogyakarta.
- Ramsay, M. Margaret dan W. K. Dixon. 2003. Propagation Science, Recovery, And Translocation Of Terrestrial. *Copyright Of Orchid Conservation*.
- Sari, Y.P., H. Manurung dan Aspiyah. 2011. Pengaruh Pemberian Air Kelapa Terhadap Pertumbuhan Anggrek Kantog Semar (*Paphiopedilum sypardii* Braem & Loeb)

- Pada Media Knudson Secara In Vitro. *Mulawarman Scientifie* 10 (2). ISSN 1412 – 498X
- Semiarti, E., A. Indrianto, A. S. Eko, L.N. Rizqie, dan R. Ratih. 2010. Mikropropagasi Tanaman Anggrek Hitam *Coelogyne pandurata* Lindl. Dengan Penyisipan Gen Penumbuh Tunas Melalui *Agrobacterium*. Yogyakarta : Seminar Nasional Biologi 2010.
- Shintiavira., H.I. Rahmawati dan B. Winarto. 2014. Aplikasi Modifikasi Media Generik Dalam Produksi Bibit Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) Berkualitas Melalui Kultur *In Vitro*. Cianjur: *Jurnal Hortikultura* 24(3):220-229.
- Sinambela, D. 2008. Kajian Perkembangan dan Dormansi pada Biji Padi (*Oryza sativa* L.) Varietas Ariza dan Sunggal Serta Pemecahannya. Medan : Sekolah Pascasarjana Agronomi Universitas Sumatera Utara.
- Teixeira da Silva, J.A. 2012. New Basal Media for Protocorm-Like Body and Callus Induction of Hybrid *Cymbidium*. Japan : *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 20 (2) 2012 : 127-133.
- Tjitrosoepomo, G. 2013. Morfologi Tumbuhan. Cetakan ke-19. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Tuhuteru, S., M.L. Hehanussa, dan S.H.T. Raharjo. 2012. Pertumbuhan Dan Perkembangan Anggrek *Dendrobium anosmum* Pada Media Kultur *In Vitro* Dengan Beberapa Konsentrasi Air Kelapa. *Agrologia*, 1(1) : 1-12.
- Udomdee, W., W. Pei-Jung, L. Chen-Yu, C. Shih-Wen, and C. Fure-Chyi. 2014. Effect of Sucrose Concentration and Seed Maturity on In vitro Germination of *Dendrobium nobile* hybrids. *Plant Growth Regulation* 72 : 249–255.
- Utami, E. S. W., S. Issirep, Taryono dan S. Endang. 2007. Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl: Struktur Dan Pola Perkembangan. Yogyakarta: *Berk. Penel. Hayati*: 13 (33–38).
- Vogel, N. Ingrid, F. Andrea and Macedo. 2011. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., medicinal orchid. Brazil: *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:147–155.
- Widiastoety. 2001. *Penambahan Persenyawaan Organik Kompleks dalam Media Kultur in vitro pada Anggrek*. East Java Orchid Show. Jawa Timur.
- Wijayani, Y., Solichatun dan M. Widya. 2007. Pertumbuhan Tunas dan Struktur Anatomi Protocorm Like Body Anggrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl. dengan Pemberian Kinetin dan NAA. Surakarta : *Bioteknologi* 4 (2): 33-40.
- Yulia, N.D. 2010. Evaluasi Keragaman Anggrek Kawasan Hutan Alam Jawa Timur Bagian Selatan. Purwodadi : Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.