

**Mikromorfologi dan Perkecambahan *In Vitro* Biji Anggrek Endemik Sulawesi:
Phalaenopsis venosa Shim & Fowlie**

***Micromorphology and In Vitro Seed Germination of Endemic Orchid of Sulawesi:
Phalaenopsis venosa Shim & Fowlie***

Eka Martha Della Rahayu*, Winda Utami Putri, Fitri Fatma Wardani, dan Lydia Natalia Endewip

Pusat Riset Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-Badan Riset dan Inovasi Nasional
Jl. Ir. H. Juanda No. 13 Bogor, Jawa Barat 16003, Indonesia

Diterima 17 Desember 2021/Disetujui 6 April 2022

ABSTRACT

Phalaenopsis venosa Shim & Fowlie, one of Sulawesi's endemic orchid species, is threatened to extinction, hence require conservation efforts. Capsules of *P. venosa* were harvested six months after pollination. Seeds were stored in the freezer at -4 °C for nine months. Micromorphology was observed using a light microscope OPTIKA M-699. The seeds of *P. venosa* were 91.99±17.73 µm long and 20.64 ±4.34 µm wide, containing embryos 52.27±12.13 µm long and 16.72±3.42 µm wide, and the air space was 13.25%±11.65%. The experiment used a completely randomized design with one factor, namely six media and six replications. Media for germination including modified Hyponex (HS), modified Vacin & Went (mVW), modified Knudson's C (mKC), Knudson's C (KCA), Murashige & Skoog half concentration (1/2MS), and Murashige & Skoog (MS). The highest germination rate at 12 weeks after planting (12 WAP) was found in HS (70.52%). The average number of seeds germinating in HS at 12 WAP was 14.35 seeds, but the development of protocorms was slower compared to 1/2MS, which showed the development of rhizoid and leaf primordia. This is due to the higher nutritional content of 1/2MS compared to HS.

Keywords: germination media, Orchidaceae, seed micromorphology

ABSTRAK

Phalaenopsis venosa Shim & Fowlie adalah anggrek endemik Sulawesi terancam punah sehingga perlu dilakukan upaya konservasi. Tujuan penelitian untuk mengetahui mikromorfologi dan media perkecambahan *in vitro* untuk mendukung upaya konservasi *P. venosa*. Biji *P. venosa* dipanen pada enam bulan setelah penyerbukan dan disimpan di freezer pada suhu -4 °C selama sembilan bulan. Pengamatan mikromorfologi menggunakan mikroskop cahaya OPTIKA M-699. Biji *P. venosa* memiliki panjang 91.99±17.73 µm, lebar 20.64 ±4.34 µm; serta embrio dengan panjang 52.27±12.13 µm, lebar 16.72±3.42 µm, dan rongga udara 13.25% ± 11.65%. Pengujian perkecambahan menggunakan rancangan acak lengkap dengan satu faktor, yaitu enam macam media, dan enam ulangan. Media perkecambahan yang diujikan yaitu Hyponex modifikasi (HS), Vacin & Went modifikasi (mVW), Knudson's C modifikasi (mKC), Knudson's C (KCA), Murashige & Skoog setengah konsentrasi (1/2MS), dan Murashige & Skoog (MS). Tingkat perkecambahan tertinggi pada 12 minggu setelah tanam (12 MST) terdapat pada media HS (70.52%) dengan rata-rata 14.35 biji berkecambah. Perkembangan protokorm di media HS lebih lambat dibandingkan perkembangan protokorm di media 1/2MS yang menunjukkan pembentukan rhizoid dan pucuk daun. Hal itu karena media 1/2MS lebih kaya nutrisi dibandingkan dengan media HS.

Kata kunci: media perkecambahan, mikromorfologi biji, Orchidaceae

PENDAHULUAN

Salah satu anggrek endemik Sulawesi adalah *Phalaenopsis venosa* Shim & Fowlie yang merupakan anggrek epifit dan memiliki banyak variasi warna bunga (Handoyo dan Prasetya, 2012). Keragaman warna bunga

dapat digunakan dalam program pemuliaan tanaman untuk memperoleh karakter unggul. Warna bunga pada anggrek *Phalaenopsis* umumnya dibentuk oleh dua pigmen utama, yaitu antosianin dan karotenoid (Handini *et al.*, 2016). Bunga dan buah masak *P. venosa* dapat dilihat pada Gambar 1A dan 1B.

Status *P. venosa* terancam punah karena pengoleksian secara langsung di alam oleh para pemburu anggrek untuk diperjualbelikan. Anggrek *P. venosa* termasuk ke dalam

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: emdrahayu@gmail.com

Apendiks II (CITES, 2021). Jenis ini juga termasuk salah satu Spesies Prioritas untuk dikonservasi kategori A, yang artinya perlu segera dilakukan aksi konservasinya (Risna *et al.*, 2010). Ancaman lain bagi kelestarian *P. venosa* adalah deforestasi. Menurut Global Forest Watch (2021), luasan hutan primer di Sulawesi berkurang 25.58 kha pada tahun 2020. Oleh karena itu, perlu dilakukan upaya konservasi bagi *P. venosa*, baik secara *in situ* maupun *ex situ*. Konservasi *in situ* dapat dilakukan dengan cara melestarikan habitat alami *P. venosa* melalui pembentukan taman nasional dan hutan lindung. Sedangkan upaya konservasi *ex situ* dapat dilakukan dengan cara mengoleksi tanaman hidup, menyimpan biji di bank biji, dan memperbanyak *P. venosa* di Kebun Raya.

Penyimpanan biji penting untuk konservasi dan pemuliaan tanaman. Biji dari berbagai jenis anggrek telah disimpan pada berbagai suhu, seperti 25, 5, 4, -4, -20, -80, dan -196 °C (Pritchard dan Seaton, 1993; Seaton *et al.*, 2018). Penyimpanan biji *Phalaenopsis* spp. diantaranya telah dilakukan pada *Phalaenopsis* Sogo 'Little Angel' × 'Golden Treasure' pada suhu -196 °C dan 4 °C (Mweetwa *et al.*, 2007) dan *Phalaenopsis amabilis* Blume pada suhu -20 °C (Puspitaningtyas dan Handini, 2021).

Biji berperan penting dalam regenerasi, distribusi, dan konservasi suatu jenis anggrek. Verma *et al.* (2014) menyatakan bahwa mode penyebaran biji dan ukuran biji merupakan faktor penting dalam mengatur pertumbuhan populasi baru. Biji anggrek sangat bervariasi dalam bentuk, warna, ukuran, volume embrio, dan struktur testa (Diantina *et al.*, 2020). Morfologi biji terkait erat dengan proses biologis dan ekologis seperti dormansi biji dan perkecambahan (Prasongsom *et al.*, 2017) serta adaptasi untuk penyebaran biji (Arditti dan Ghani, 2000; Gamarra *et al.*, 2018).

Perbanyakkan anggrek *P. venosa* dapat dilakukan dengan kultur biji. Perkecambahan *in vitro* biji anggrek penting untuk upaya konservasi dan perbanyakkan anggrek alam karena menghasilkan bibit dalam jumlah besar serta memiliki tingkat keanekaragaman yang tinggi (Teixeira da Silva *et al.*, 2015). Keanekaragaman genetik merupakan faktor penting bagi reintroduksi jenis tumbuhan ke alam liar (Ren *et al.*, 2014).

Media perkecambahan biji anggrek berbeda-beda dan bersifat spesifik untuk setiap jenis (Teixeira da Silva *et al.*, 2015). Kultur biji *P. venosa* telah dilakukan oleh Herlina (2012) dan Kartikaningrum *et al.* (2017). Kedua penelitian tersebut menggunakan biji masak dan segar, yang tidak mengalami penyimpanan di suhu rendah. Hasil penelitian Herlina (2012) menunjukkan bahwa biji *P. venosa* berkecambah dengan baik pada dua bulan setelah semai (2 BST) di media Knudson'C modifikasi 70% dan media Murashige & Skoog setengah konsentrasi (1/2MS). Penelitian Kartikaningrum *et al.* (2017) menunjukkan bahwa persentase perkecambahan biji *P. venosa* di media Vacin & Went pada 23 hari setelah semai adalah 40%. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur biji anggrek antara lain adalah media dasar yang digunakan, penambahan bahan

organik ke dalam media kultur (1, 2, atau 3 g L⁻¹ pepton; 50 g L⁻¹ homogenat pisang ambon lumut, 15% (v/v) air kelapa) serta umur eksplan (Schwallier *et al.*, 2011; Balilashaki *et al.*, 2014; Balilashaki *et al.*, 2015a; Balilashaki *et al.*, 2015b; Kartikaningrum *et al.*, 2017; Abbaszadeh *et al.*, 2018; Utami dan Hariyanto, 2019).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui mikromorfologi dan media perkecambahan *in vitro* terbaik bagi biji masak *P. venosa* yang telah disimpan pada suhu -4 °C, untuk mendukung upaya konservasinya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Treub, Laboratorium Kultur Jaringan Bank Biji dan Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Riset Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-Badan Riset dan Inovasi Nasional (PRKTKR-BRIN), sejak 1 Februari sampai dengan 7 September 2021. Bahan penelitian adalah biji *Phalaenopsis venosa* koleksi Kebun Raya Massenrempulu Enrekang, Sulawesi Selatan, yang dipanen pada umur enam bulan setelah penyerbukan (Gambar 1B). Biji diekstrak lalu disimpan di dalam botol kaca tertutup yang berisi *silica gel* selama tujuh hari. Setelah itu, biji disimpan di dalam amplop kertas lalu dimasukkan ke dalam plastik klip yang berisi *silica gel*. Biji kemudian disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -4 °C selama sembilan bulan.

Mikromorfologi Biji dan Embrio *P. venosa*

Pengamatan mikromorfologi meliputi karakter kualitatif dan kuantitatif. Pengamatan mikromorfologi biji meliputi bentuk biji (BB), warna biji (WB), panjang biji (PB), lebar biji (LB), rasio panjang biji/lebar biji (PB/LB), dan volume biji (VB). Pengamatan mikromorfologi embrio meliputi bentuk embrio (BE), warna embrio (WE), panjang embrio (PE), lebar embrio (LE), perbandingan panjang embrio/lebar embrio (PE/LE), volume embrio (VE), perbandingan volume biji/volume embrio (VB/VE), dan ruang udara (RU). Volume biji (μm^3) dihitung dengan rumus $= 2 [(P/2) (L/2)^2 (\pi/3)]$, dan volume embrio (μm^3) dihitung dengan rumus $4/3 \pi (P/2) (L/2)^2$, dimana P = panjang, L = lebar, $\pi = 22/7$. Persentase ruang udara (RU %) dihitung dengan metode: $(\text{volume biji} - \text{volume embrio})/\text{volume biji} \times 100 \%$ (Arditti dan Ghani, 2000).

Pengamatan mikromorfologi biji *P. venosa* dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya OPTIKA M-699 pada perbesaran 100x. Pengamatan dilakukan pada 30 biji *P. venosa* secara acak (Hariyanto, 2019). Biji *P. venosa* disebar di kaca objek lalu ditetesi akuades kemudian ditutup dengan kaca penutup. Panjang dan lebar biji serta embrio diukur dari bagian terpanjang dan terlebar dari biji dan embrio. Pengukuran dilakukan menggunakan piranti lunak Optika Vision Lite 2.1. Data hasil pengukuran dihitung nilai rata-ratanya.

Perkecambahan *In Vitro* Biji *P. venosa*

Sterilisasi biji di luar Laminar Air Flow Cabinet (LAFC) dengan cara biji dimasukkan ke dalam botol berisi akuades steril yang ditambah 3 tetes Tween 20, lalu divakum selama satu jam. Setelah divakum, biji angrek mengendap di dasar botol. Larutan Tween 20 lalu dikeluarkan dengan cara dihisap menggunakan pipet sehingga biji tetap ada di dasar botol. Proses sterilisasi lalu dilanjutkan di dalam LAFC. Biji direndam dalam larutan NaOCl 0.525% yang ditambah 3 tetes Tween 20 selama 10 menit. NaOCl 0.525% lalu dikeluarkan dari botol menggunakan pipet. Setelah itu biji direndam dengan larutan NaOCl 0.2625% yang ditambah 3 tetes Tween 20 selama lima menit. Selanjutnya biji *P. venosa* dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Bilasan akuades terakhir disisakan secukupnya untuk membantu penyebaran biji *P. venosa* di media perkecambahan. Sebanyak 1 mL suspensi akuades dan biji *P. venosa* disebar di media perkecambahan. Lalu akuades dihisap dengan pipet sehingga hanya biji yang tetap ada di media perkecambahan.

Media perkecambahan *in vitro* yang diujikan adalah media standar untuk uji perkecambahan biji angrek di Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya. Biji *P. venosa* disemai di enam macam media, yaitu media Hyponex modifikasi (HS), Vacin & Went modifikasi (mVW), Knudson's C modifikasi (mKC), Knudson's C (KCA), Murashige & Skoog setengah konsentrasi (1/2MS), serta Murashige & Skoog (MS) (Murashige dan Skoog, 1962; Puspitaningtyas dan Handini, 2014; Utami dan Hariyanto, 2019; Rahayu dan Mulyani, 2020).

Komposisi media HS terdiri atas 0.5 g L⁻¹ pupuk Hyponex, 40 g L⁻¹ homogenat kentang, 2 g L⁻¹ pepton, dan 1 g L⁻¹ arang aktif. Media mVW terdiri atas makronutrien dan mikronutrien Vacin & Went dengan penambahan 100 g L⁻¹ ekstrak tauge, 100 g L⁻¹ homogenat tomat, 15% (v/v) air kelapa, 10 mg L⁻¹ NAA, dan 1 g L⁻¹ arang aktif. Media mKC terdiri atas makronutrien dan mikronutrien Knudson's C dengan penambahan 15% (v/v) air kelapa, 150 g L⁻¹ ekstrak tauge, dan 1 g L⁻¹ arang aktif. Sedangkan media KC hanya mengandung makronutrien dan mikronutrien Knudson's C. Media 1/2MS terdiri atas makronutrien, mikronutrien, vitamin dan asam amino MS setengah konsentrasi. Sedangkan media MS terdiri atas makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino MS (Murashige dan Skoog, 1962). Keenam media tersebut mengandung 30 g L⁻¹ gula dan 8 g L⁻¹ agar. pH media diatur pada 5.6-5.8. Media diautoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm, selama 15 menit. Sebanyak 20 mL media dituang ke cawan petri 90 mm x 15 mm.

Setelah biji disemai di media kultur, petri langsung ditutup dengan *plastic wrap*. Kultur biji diinkubasi pada suhu 25±2 °C dan kelembapan relatif 80% di bawah lampu fluoresens dengan fotoperiodisitas 12/12 jam (terang/gelap). Pengujian perkecambahan menggunakan rancangan acak lengkap dengan satu faktor, yaitu enam macam media perkecambahan. Setiap perlakuan terdiri atas enam ulangan. Perkecambahan biji dan tahapan perkembangan protokorm

P. venosa diamati di bawah mikroskop cahaya OPTIKA M-699 yang terkoneksi dengan komputer pada pembesaran 100x. Tahapan perkecambahan dan perkembangan protokorm mengacu Utami dan Hariyanto (2019) serta Rahayu dan Mulyani (2020). Jumlah biji yang berkecambah, protokorm dengan rhizoid, serta protokorm dengan rhizoid dan pucuk daun pada satu, empat, delapan, dan 12 minggu setelah tanam (1, 4, 8, dan 12 MST) dihitung berdasarkan 100-200 biji yang disemai pada 10 bidang pandang. Data lalu dianalisa dengan ANOVA dan Duncan Post Hoc Test. Pengamatan perkecambahan biji dan tahapan perkembangan protokorm dilakukan selama 12 minggu setelah tanam (12 MST) (Utami dan Hariyanto, 2019; Rahayu dan Mulyani, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mikromorfologi Biji dan Embrio *P. venosa*

Biji *P. venosa* berbentuk fusiformis, berwarna coklat dan transparan, serta sel dinding testa berbentuk silindris (Gambar 1C, Tabel 1). Embrio *P. venosa* berbentuk bulat telur dan berwarna kuning muda (Gambar 1C dan Tabel 1). Biji *P. venosa* memiliki panjang 91.99±17.73 µm dan lebar 20.64±4.34 µm (Tabel 2). Perbandingan panjang biji (PB) dan lebar biji (LB) dapat memberikan informasi tentang derajat pemendekan biji (*seed truncation*) yang merupakan salah satu karakter taksonomi yang baik (Verma *et al.*, 2014). Menurut Verma *et al.* (2014), biji dikatakan memendek (*truncated*) jika memiliki PB/LB < 6.0 dan memanjang (*elongated*) jika memiliki PB/LB > 6.0. Biji *P. venosa* pada penelitian ini menunjukkan nilai PB/LB adalah 2.31±1.76 (Tabel 2) sehingga termasuk biji memendek (*truncated seed*). Volume biji *P. venosa* pada penelitian ini adalah 10,921.90±6,660.59 µm³ (Tabel 2).

Embrio *P. venosa* terletak di tengah biji (Gambar 1C). Embrio *P. venosa* memiliki panjang 52.27±12.13 µm, lebar 16.72±3.42 µm, dan volume sebesar 4,650.71±3,999.76 µm³ (Tabel 2). Menurut Verma *et al.* (2014), volume embrio merupakan salah satu karakter penting yang berpengaruh langsung terhadap persentase rongga udara di dalam suatu biji. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa nilai perbandingan volume biji (VB) dan volume embrio (VE) *P. venosa* adalah 0.69±0.55. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian Hariyanto (2019) yang menunjukkan bahwa nilai perbandingan VB/VE dari *P. venosa* tidak melebihi dua. Rongga udara *P. venosa* pada penelitian ini adalah 13.25±11.65 % (Tabel 2). Rongga udara tersebut berguna bagi *P. venosa* dalam proses penyebaran biji karena penyebaran biji dari suku Orchidaceae dibantu oleh angin (Arditti dan Ghani, 2000; Diantina *et al.*, 2020).

Perkecambahan *In Vitro* Biji *P. venosa*

Hasil pengamatan pada 12 MST menunjukkan bahwa persentase perkecambahan biji masak *P. venosa* yang telah disimpan pada suhu -4 °C selama sembilan bulan, berkisar 0.2-70.52% (Tabel 3). Persentase perkecambahan tertinggi

Tabel 1. Karakter mikromorfologi biji dan embrio *P. venosa*

Karakter	Keterangan
Biji	
Bentuk	Fusiformis
Warna	Coklat dan transparan
Bentuk sel dinding testa	Silindris
Embrio	
Bentuk embrio	Bulat telur
Warna embrio	Kuning muda

(70.52%) dan rata-rata jumlah biji berkecambah tertinggi (14.35 biji) terdapat pada media Hyponex modifikasi (HS). Berdasarkan uji ANOVA, jumlah biji berkecambah berbeda signifikan dibandingkan dengan media lainnya. Hasil penelitian Puspitaningtyas dan Handini (2021) juga menunjukkan bahwa perkecambahan tertinggi biji masak *P. amabilis* yang disimpan pada suhu rendah (-20 °C) selama 1-8 tahun terdapat di media HS. Media HS mengandung 2 g L⁻¹ pepton. Pepton meningkatkan persentase perkecambahan pada kultur biji *Phalaenopsis* cv. 'Dublin' (Balilashaki *et al.*, 2015b) dan *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. (Setiari *et al.*, 2016). Hal tersebut karena pepton berperan penting dalam aktivasi gen-gen yang berhubungan dengan fungsi klorofil dalam proses fotosintesis (Setiari *et al.*, 2016). Pepton juga berfungsi sebagai sumber Nitrogen dan asam amino sehingga dapat meningkatkan perkecambahan biji angrek. Asam amino penting dalam proses biosintesis molekul klorofil yang akan mempengaruhi kandungan karbohidrat dalam sel tumbuhan (Soad *et al.*, 2010).

Penyimpanan biji pada suhu rendah dan praperlakuan eksplan dengan kloroks (NaOCl) dapat mendukung perkecambahan biji angrek dengan cara mematahkan dormansi (Mweetwa *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015; Seaton *et al.*, 2018). Biji *P. venosa* pada penelitian ini mengalami

penyimpanan pada suhu -4 °C dan sterilisasi dengan kloroks. Waktu berkecambah *P. venosa* pada penelitian ini adalah 2 MST, lebih cepat daripada biji *P. venosa* segar dan tidak disterilisasi dengan kloroks pada penelitian Herlina (2012) dan Kartikaningrum *et al.* (2017). Waktu berkecambah biji *P. venosa* pada kedua penelitian tersebut berturut-turut adalah dua bulan dan 23 hari setelah tanam.

Menurut Schwallier *et al.* (2011) dan Balilashaki *et al.* (2015a), tingkat kemasakan buah berpengaruh terhadap waktu berkecambah serta persentase perkecambahan. Buah yang digunakan dalam penelitian ini termasuk kategori masak karena dipanen pada enam bulan setelah penyerbukan dan buah sudah berwarna hijau kekuningan. Persentase perkecambahan *P. venosa* pada penelitian ini lebih rendah (0.2-70.52%) daripada perkecambahan biji *P. amabilis* hibrida (>95%) dari buah yang dipanen pada lima bulan setelah penyerbukan (belum masak sempurna). Biji angrek yang sudah masak memiliki kulit biji bagian dalam yang kaku (karapas). Semakin masak biji maka dinding karapas semakin mengalami lignifikasi. Akhirnya, biji angrek yang masak menjadi dorman karena impermeabilitas (Balilashaki *et al.*, 2015a). Hal tersebut diduga terjadi pada biji *P. venosa* yang digunakan pada penelitian ini.

Tahap perkembangan biji dan protokorm *P. venosa* (Gambar 1C, D, E, dan F) sejalan dengan hasil penelitian Utami dan Hariyanto (2019) pada *Phalaenopsis amboinensis* J.J. Smith serta Rahayu dan Mulyani (2020) pada *Dendrobium spectabile* Blume (Miq.). Tahap perkembangan dimulai dengan biji yang baru disemai belum menunjukkan perubahan. Tahap kedua, biji mulai membengkak karena proses imbibisi dan masih terbungkus testa. Tahap ketiga, embrio membesar dan testa pecah (berkecambah). Selanjutnya pada tahap 4, protokorm menunjukkan adanya perkembangan rhizoid dan pada tahap 5, protokorm menunjukkan adanya perkembangan pucuk daun.

Biji *P. venosa* mulai berkecambah pada 2 MST di media HS dan pada 14 MST memiliki perkecambahan tertinggi dibandingkan dengan media lainnya (Gambar 2A).

Tabel 2. Data mikromorfometri dari karakter biji dan embrio *P. venosa*

Karakter	Nilai rata-rata
Biji	
Panjang biji	91.99±17.73 µm
Lebar biji	20.64±4.34 µm
Panjang biji/lebar biji	2.31±1.76
Volume biji (µm ³)	10,921.90±6,660.59 µm ³
Embrio	
Panjang embrio	52.27±12.13 µm
Lebar embrio	16.72±3.42 µm
Panjang embrio/lebar embrio	1.70±1.27
Volume embrio	4,650.71±3,999.76 µm ³
Volume biji/volume embrio	0.69±0.55
Rongga udara (%)	13.25±11.65%

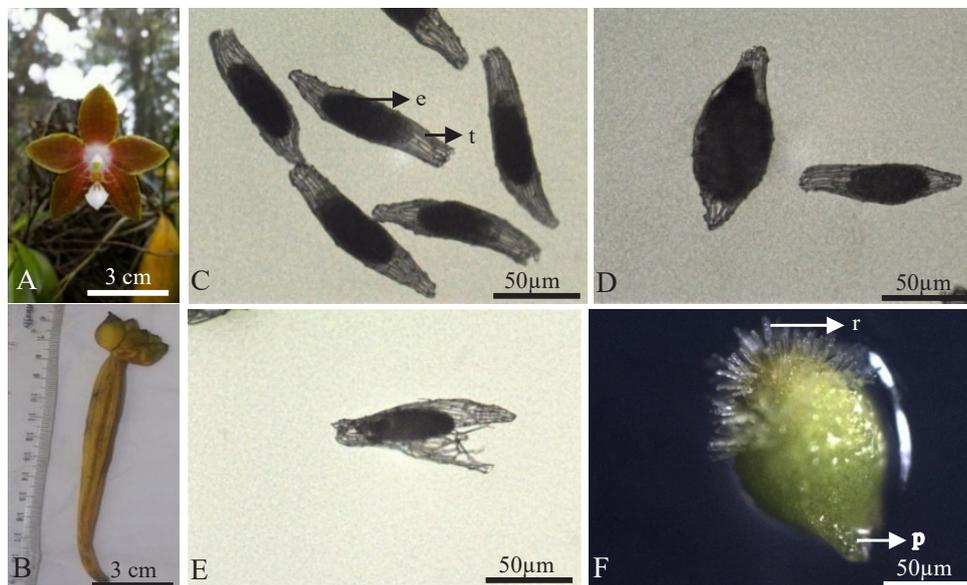
Tabel 3. Pengaruh media semai pada perkecambahan biji *P. venosa* pada 12 minggu setelah tanam (12 MST)

Media	Persentase perkecambahan (%)	Jumlah rata-rata		
		Biji berkecambah	Protokorm dengan rhizoid	Protokorm dengan pucuk daun
HS	70.52	14.35a	0.03b	0.00b
VW modifikasi	0.20	0.02c	0.00b	0.00b
KC modifikasi	2.92	0.17c	0.00b	0.00b
KCA	14.03	1.60bc	0.18b	0.00b
1/2MS	25.63	4.42b	0.58a	0.45a
MS	11.82	1.82bc	0.18b	0.00b

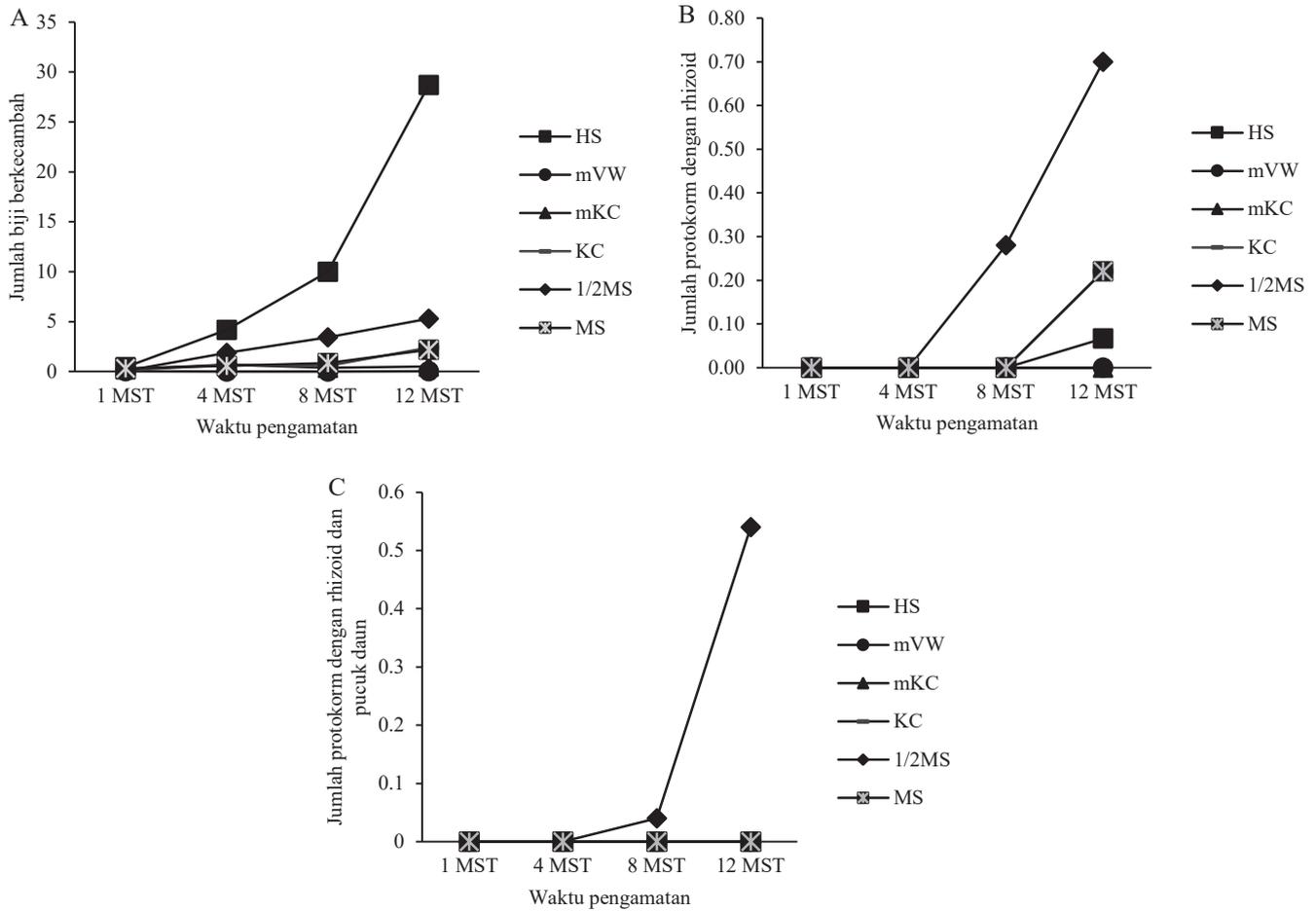
Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada taraf $\alpha = 5\%$

Akan tetapi, pertumbuhan rhizoid tercepat ditemukan pada media 1/2MS yang mulai menunjukkan pertumbuhan pada 4 MST dan jumlah terbanyak pada 12 MST (Gambar 2B). Pertumbuhan terbanyak pucuk daun juga ditemukan pada media 1/2MS (Tabel 3, Gambar 2C). Dengan demikian, perkembangan protokorm di media HS lebih lambat daripada perkembangan protokorm di media 1/2MS. Hal tersebut diduga karena media HS memiliki konsentrasi Nitrogen, Fosfor, Kalium serta vitamin, asam amino dari bahan organik yang ditambahkan, lebih rendah daripada konsentrasi bahan-bahan tersebut di dalam media 1/2MS. Hasil penelitian Puspitaningtyas dan Handini (2021) juga menunjukkan bahwa walaupun persentase perkecambahan

P. amabilis di media HS tertinggi, namun perkembangan protokorm kurang baik, yaitu jumlah rhizoid lebih sedikit dan protokorm berwarna coklat kekuningan. Hasil penelitian Shekarriz *et al.* (2014) dan Abbaszadeh *et al.* (2018) juga menunjukkan bahwa media 1/2MS mendukung perkembangan protokorm. Hal tersebut karena media 1/2MS kaya akan Nitrogen, baik dalam bentuk makronutrien maupun mikronutrien. Keberadaan ammonium nitrat dalam media MS berpengaruh dalam perkembangan protokorm (Paul *et al.*, 2012). Selain itu, media 1/2MS juga mengandung vitamin dan asam amino. Media MS mengandung ion Ca^{2+} yang dibutuhkan untuk sintesis dinding sel dan membran sel (Erfani *et al.*, 2017).



Gambar 1. Bunga, buah masak (A-B), serta tahap perkembangan biji dan protokorm *P. venosa* (C-F). A. bunga. B. buah masak, C. Tahap 1: Biji *P. venosa*, tampak testa (t) dan embrio (e). D. Tahap 2: Biji di sebelah kiri terimbibisi, membesar, dan masih terbungkus testa. E. Tahap 3: Embrio membesar dan testa pecah (berkecambah). F. Tahap 4 (Protokorm dengan rhizoid (r)) dan Tahap 5 (Protokorm dengan rhizoid (r) dan pucuk daun (p)). Perbesaran 100x



Gambar 2. Pengaruh media semai terhadap perkecambah dan perkembangan protokorm *P. venosa* pada 1, 4, 8, dan 12 minggu setelah tanam (MST): A. biji berkecambah, B. protokorm dengan rhizoid, C. Protokorm dengan rhizoid dan pucuk daun. HS = Hyponex modifikasi, mVW = Vacin & Went modifikasi, mKC = Knudson's C modifikasi, KCA = Knudson's C, 1/2MS = Murashige & Skoog setengah konsentrasi, MS = Murashige & Skoog

KESIMPULAN

Biji anggrek *P. venosa* memiliki panjang $91.99 \pm 17.73 \mu\text{m}$, lebar $20.64 \pm 4.34 \mu\text{m}$, serta embrio dengan panjang $52.27 \pm 12.13 \mu\text{m}$ dan lebar $16.72 \pm 3.42 \mu\text{m}$, dan rongga udara sebesar $13.25\% \pm 11.65\%$. Persentase perkecambahan biji *P. venosa* tertinggi pada media Hyponex modifikasi (HS) yang mengandung pepton. Akan tetapi, perkembangan protokorm di media 1/2MS lebih baik daripada perkembangan protokorm di media HS. Oleh karena itu, setelah berkecambah, protokorm sebaiknya disubkultur ke media 1/2MS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Pusat Riset Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-BRIN melalui program penelitian In House 2021. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kebun Raya Massenrempulu Enrekang atas sumbangan buah *P. venosa*. Penulis juga mengucapkan terima kasih atas bantuan teknis dan fasilitas dari Unit Bank Biji, Laboratorium Treub, dan Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-BRIN.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbaszadeh, S.M., S.M. Miri, R. Naderi. 2018. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Phalaenopsis* 'Bahia Blanca'. *J. Ornamental Plants* 8:183-192.
- Arditti, J., A.K.A. Ghani. 2000. Tansley Review No. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* 145:367-421.
- Balilashaki, K., R. Naderi, S. Kalantari, M. Vahedi. 2014. Efficient *in vitro* culture protocols for propagating *Phalaenopsis* 'Cool Breeze'. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 24:191-203.
- Balilashaki, K., S. Gantait, R. Naderi, M. Vahedi. 2015a. Capsule formation and asymbiotic seed germination in some hybrids of *Phalaenopsis*, influenced by pollination season and capsule maturity. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 21:341-347.

- Balilashaki, K., R. Naderi, S. Gantait, M. Vahedi. 2015b. Asymbiotic germination of *Phalaenopsis* cv. 'Dublin' seeds in relation to pollination months and nutrient media. *Not. Sci. Biol.* 7:330-333.
- Chen, Y., U. M. Goodale, X.L. Fan, J.Y. Gao. 2015. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Glob. Ecol. Conserv.* 3:367-378.
- CITES. 2021. *Phalaenopsis venosa*. <https://cites.org> [22 Juni 2021].
- Diantina, S., C. McGill, J. Millner, J. Nadarajan, H.W. Pritchard, A.C. McCormick. 2020. Comparative seed morphology of tropical and temperate orchid species with different growth habits. *Plants* 9:1-11. Doi: 10.3390/plants9020161.
- Erfani, M., S.M. Miri, A. Imani. 2017. *In vitro* shoot proliferation and rooting of Garnem rootstock as influenced by basal media, plant growth regulators and carbon sources. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 18:101-109.
- Gamarra, R., E. Ortúñez, P.G. Cela, A. Merencio. 2018. Seed micromorphology of Orchidaceae in the Gulf of Guinea (West Tropical Africa). *Plant Syst. Evol.* 304:665-677.
- Global Forest Watch. 2021. Indonesia Country Summary, Dashboard. <https://www.globalforestwatch.org> [30 Maret 2021].
- Handini, A.S., D. Sukma, Sudarsono. 2016. Analisis keragaman morfologi dan biokimia pada anggrek *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *J. Agron. Indonesia* 44:62-67.
- Handoyo, F., R. Prasetya. 2012. *Orchids of Sulawesi*. Indonesian Orchid Society, Jakarta.
- Hariyanto. 2019. Variations in seed micromorphology and morphometry of native Indonesian *Phalaenopsis* and *Paphiopedilum* orchids. *Biodiversitas* 20:3559-3567.
- Herlina, D. 2012. Konservasi anggrek *Phalaenopsis* dengan perbanyak biji secara *in vitro*. *Iptek Hortikultura* 8:29-35.
- Kartikaningrum, S., D. Pramanik, M. Dewanti, R. Soehendi, M.P. Yufdy. 2017. Konservasi anggrek spesies alam menggunakan eksplan biji pada media Vacin & Went. *Bul. Plasma Nutfah* 23:109-118.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Mweetwa, A.M., G.E. Welbaum, D. Tay. 2007. Orchid seed storage for germplasm preservation. *Acta Hortic.* 760:629-635.
- Paul, S., S. Kumaria, P. Tandon. 2012. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. *AoB PLANTS* 2012: plr032; Doi:10.1093/aobpla/plr032.
- Prasongsom, S., K. Thammasiri, H.W. Pritchard. 2017. Seed micromorphology and *ex vitro* germination of *Dendrobium* orchids. *Acta Hortic.* 1167:339-344.
- Pritchard, H.W., P.T. Seaton. 1993. Orchid seed storage: Historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbiyana* 14:89-104.
- Puspitaningtyas, D.M., E. Handini. 2014. Penyimpanan biji anggrek *Coelogyne* spp. untuk konservasi *ex situ*. *Buletin Kebun Raya* 17:101-112.
- Puspitaningtyas, D.M., E. Handini. 2021. Seed germination evaluation of *Phalaenopsis amabilis* in various media for long-term conservation. *Biodiversitas* 22:5231-5238.
- Rahayu, E.M.D., M. Mulyani. 2020. Asymbiotic seed germination and plantlet development of *Dendrobium spectabile* (Blume) Miq. *Buletin Kebun Raya* 23:25-35.
- Ren, H., S.G. Jian, H.X. Liu, Q.M. Zhang, H.F. Lu. 2014. Advances in the reintroduction of rare and endangered wild plant species. *Sci. China Life Sci.* 57:603-609.
- Risna, R.A., Y.W.C. Kusuma, D. Widyatmoko, R. Hendrian, D.O. Pribadi. 2010. Spesies Prioritas untuk Konservasi Tumbuhan Indonesia seri I: Arecaceae, Cyatheaceae, Nepenthaceae, Orchidaceae. LIPI Press, Jakarta.
- Schwallier, R., V. Bhoopalan, S. Blackman. 2011. The influence of seed maturation on desiccation tolerance in *Phalaenopsis amabilis* hybrids. *Sci. Hortic.* 128:136-140.
- Seaton, P.T., S.T. Hosomi, C.C. Custódio, T.R. Marks, N.B. Machado-Neto, H.W. Pritchard. 2018. Orchid seed and pollen: A toolkit for long-term storage, viability assessment and conservation. p. 71-98. *In* Lee, Y.I., E.C.T. Yeung (Eds.). *Orchid propagation: From laboratories to greenhouses-Methods and protocols*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, New York.

- Setiari, N., A. Purwantoro, S. Moeljopawiro, E. Semiarti. 2016. Peptone and tomato extract induced early stage of embryo development of *Dendrobium phalaenopsis* orchid. J. Tropical Biodiversity Biotechnology 1:77-84.
- Shekarriz, P., M. Kafi, S. Dianati, M. Mirmasoumi. 2014. Coconut water and peptone improve seed germination and protocorm like body formation of hybrid *Phalaenopsis*. Agric. Sci. Dev. 3:317-322.
- Soad, M.M. Ibrahim, Lobna, S. Taha, M.M. Farahat. 2010. Influence of foliar application of peptone on growth, flowering and chemical composition of *Helichrysum bracteatum* plants under different irrigation intervals. Ozean J. Appl. Sci. 3:143-155.
- Teixeira da Silva, J.A., E.A. Tsavkelova, T.B. Ng, S. Parthibhan, J. Dobránszki, J.C. Cardoso, M.V. Rao, S. Zeng. 2015. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. Plant Cell Rep. 34:1685-1706.
- Utami, E.S.W., S. Hariyanto. 2019. *In vitro* seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm. Hindawi Scientifica 2019:1-6.
- Verma, J., K. Sharma, K. Thakur, J.K. Sembi, S.P. Vij. 2014. Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids. Turk. J. Bot. 38:234-251.