



PERKECAMBAHAN BIJI ANGGREK *Grammatophyllum stapeliiflorum* PADA MEDIA MS DENGAN PENAMBAHAN BAP SECARA *IN VITRO*

GERMINATION OF *Grammatophyllum stapeliiflorum* ORCHID SEEDS ON MS MEDIA WITH THE ADDITION OF BAP *IN VITRO*

Iga Permata Hany, Zozy Aneloi Noli*, Suwirmen
Universitas Andalas, Jl. Kampus Limau Manis, 25163 Padang
*Corresponding author: zozynoli@sci.unand.ac.id

Naskah Diterima: 12 Agustus 2022; Direvisi: 14 Januari 2023; Disetujui: 1 Juni 2023

Abstrak

Grammatophyllum stapeliiflorum merupakan jenis anggrek epifit dengan pertumbuhan vegetatif dan generatif yang relatif lambat. Anggrek ini termasuk ke dalam kelompok CITES Apendiks II. Kultur *in vitro* merupakan usaha perbanyakan paling efektif untuk tanaman anggrek. Penggunaan media kultur dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang tepat akan meningkatkan keberhasilan perkecambahan biji anggrek secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi media MS dan penambahan BAP terbaik terhadap perkecambahan anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan berupa variasi konsentrasi media MS dan BAP, yaitu: MS penuh; MS $\frac{1}{2}$ hara makro; MS $\frac{1}{4}$ hara makro; MS penuh + 1 ppm BAP; MS $\frac{1}{2}$ hara makro + 1 ppm BAP; dan MS $\frac{1}{4}$ hara makro + 1 ppm BAP. Parameter yang diamati pada penelitian ini, yaitu waktu muncul protokorm dan persentase tahap perkecambahan biji. Data dianalisis menggunakan uji ANOVA dan uji lanjut *Duncan New Multiple Range Test* dengan taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian BAP mampu mempercepat waktu muncul protokorm. Konsentrasi media MS $\frac{1}{4}$ hara makro + 1 ppm BAP merupakan konsentrasi terbaik untuk perkecambahan biji anggrek tahap 0 hingga tahap 3, sedangkan konsentrasi media MS $\frac{1}{4}$ hara makro merupakan konsentrasi terbaik untuk mencapai tahap 4 perkecambahan biji anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*.

Kata Kunci: BAP; *Grammatophyllum stapeliiflorum*; Media MS; Perkecambahan

Abstract

Grammatophyllum stapeliiflorum is a type of epiphytic orchid with relatively slow vegetative and generative growth. This orchid is included in the CITES Appendix II group. *In vitro* culture is the most effective propagation method for orchid plants. The use of appropriate culture media and growth regulators will increase the success of orchid seed germination *in vitro*. This study aims to determine the effect of the best concentration of MS media and the addition of BAP on the germination of *G. stapeliiflorum* orchids *in vitro*. This study used a completely randomized design with 6 treatments and 4 replications. The treatments consisted of varying concentrations of MS and BAP media, namely: full MS; MS $\frac{1}{2}$ macro nutrients; MS $\frac{1}{4}$ macro nutrients; full MS + 1 ppm BAP; MS $\frac{1}{2}$ macro nutrients + 1 ppm BAP; and MS $\frac{1}{4}$ macro nutrients + 1 ppm BAP. The parameters observed in this study were the time when the protocorm appeared and the percentage of seed germination stages. Data were analyzed using the ANOVA test and the *Duncan New Multiple Range Test* with a level of 5%. The results of the study showed that administration of BAP was able to speed up the time when protocorm appeared. MS media concentration $\frac{1}{4}$ macro nutrients + 1 ppm BAP is the best concentration for stage 0 to stage 3 orchid seed germination, while MS media concentration $\frac{1}{4}$ macro nutrients is the best concentration for achieving stage 4 germination of *G. stapeliiflorum* orchid seeds *in vitro*.

Keywords: BAP; Germination; *Grammatophyllum stapeliiflorum*; MS Medium

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v17i1.27624>

PENDAHULUAN

Keragaman jenis tanaman di Indonesia sangat tinggi, salah satunya berasal dari famili *Orchidaceae*. Sekitar 5.000 jenis famili ini tersebar luas di Indonesia, diantaranya 1.327 jenis tumbuh di Pulau Jawa dan selebihnya tumbuh di Pulau Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Papua, dan pulau lainnya (Isda & Fatonah, 2014). Tanaman anggrek mempunyai potensi sangat besar untuk dikembangkan mengingat keanekaragamannya mulai terancam. Berdasarkan CITES (2015) anggrek jenis *Grammatophyllum stapeliiflorum* tergolong pada kategori Apendiks II. Keberadaan jenis anggrek ini sangat penting, karena merupakan salah satu tanaman hias komersial dengan nilai ekonomi yang tinggi. Kegiatan eksploitasi terhadap jenis anggrek ini dilakukan terus-menerus, terjadinya kerusakan dan perubahan habitat menjadi daerah pertanian atau permukiman maupun terjadinya fragmentasi habitat menyebabkan anggrek jenis *G. stapeliiflorum* ini mulai langka dan sulit dijumpai lagi di habitat aslinya. Selain itu, biji anggrek memiliki kemampuan untuk berkecambah yang sangat rendah, menurut Gogoi et al. (2012), kurang dari 5% biji anggrek mampu berkecambah di alam karena bijinya yang tidak memiliki endosperm dan membutuhkan jamur mikoriza spesifik pada tahap awal perkembangannya. Teknik perbanyak tanaman secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan perkecambahan biji anggrek.

Biji anggrek melalui beberapa tahapan perkecambahan. Rahayu dan Mulyani (2020) menggolongkannya menjadi 5 tahapan. Tahapan pertama ditandai dengan biji yang mulai bengkak namun masih tertutup testa. Tahap kedua, biji sudah mulai berkecambah terlihat dari ukuran embrio yang semakin membesar diikuti dengan pecahnya kulit biji (testa). Tahap ketiga, embrio membentuk bulatan berwarna hijau dan disebut sebagai protokorm. Tahap keempat, protokorm tumbuh membentuk struktur tunas dan rizoid. Kemudian pada tahap kelima ditandai dengan munculnya daun pertama menandakan akhir masa perkecambahan biji anggrek.

Media Murashige dan Skoog (MS) sering digunakan untuk perkecambahan khususnya perkecambahan tanaman anggrek. Penggunaan media MS dengan konsentrasi berbeda dapat memberikan pengaruh berbeda pada pertumbuhan beberapa jenis anggrek. Persentase tumbuh, jumlah, dan tinggi tunas anggrek *Cymbidium* secara umum lebih tinggi pada media $\frac{1}{4}$ dan $\frac{1}{2}$ MS dibanding MS penuh. Pengurangan komposisi pada media $\frac{1}{2}$ MS hingga $\frac{1}{4}$ MS masih mampu menopang pertumbuhan tanaman *in vitro* (Pratama, 2018). Pengurangan komposisi media kultur jaringan sering dikombinasikan dengan penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Penelitian yang dilakukan oleh Sulichantini et al. (2020) menyatakan bahwa keberhasilan kultur *in vitro* juga ditentukan oleh ZPT yang diberikan. Penambahan ZPT tertentu dapat memicu pertumbuhan tanaman secara *in vitro*. ZPT yang biasa ditambahkan pada kultur *in vitro* adalah dari golongan auksin dan sitokinin. Salah satu ZPT golongan sitokinin adalah *6-Benzylaminopurine* (BAP). Penambahan BAP pada media kultur *in vitro* dapat memicu pembelahan sel dan morfogenesis. Penelitian yang dilakukan oleh Lestari et al. (2013) menunjukkan bahwa pertumbuhan biji cenderung meningkat pada konsentrasi BAP lebih tinggi, yaitu pemberian BAP dengan konsentrasi 1,0–2,0 ppm. Berdasarkan uraian di atas, dilakukan penelitian yang mengkaji secara jelas mengenai komposisi nutrisi yang tepat pada tahap perkecambahan biji anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* secara *in vitro*.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang. Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: *Autoclave* GEA LS-75LJ, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC) Astec HLF 1.200 L, dan mikroskop stereo Olympus SZ 61. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain; buah anggrek *G. stapeliiflorum*, larutan stok media MS, larutan stok ZPT BAP, sabun anti bakteri, gula, agar, alkohol 96%, dan alkohol 70%. Buah anggrek *G. stapeliiflorum* dikoleksi di kawasan hutan Lembah Harau, Kabupaten 50 Kota, Sumatera Barat.

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas enam perlakuan dan empat kali ulangan. Perlakuan berupa variasi konsentrasi media MS dan BAP yang terdiri dari A (MS penuh), B (MS $\frac{1}{2}$ hara makro), C (MS $\frac{1}{4}$ hara makro),

D (MS penuh + BAP 1 ppm), E (MS ½ hara makro + BAP 1 ppm), dan F (MS ¼ hara makro + BAP 1 ppm).

Media Tanam

Media tanam perlakuan A, B, C, D, E, dan F masing-masing dibuat dengan volume total 500 mL. Sebanyak 15 g gula pasir dimasukkan ke dalam larutan dan dihomogenkan. Setelah larutan homogen, pH larutan disesuaikan dalam rentang 5,8–6,0. Bubuk agar dimasukkan sebanyak 3,5 g ke dalam larutan lalu dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Media dimasukkan ke dalam botol steril sebanyak 24 unit percobaan. Media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada tekanan 17,5 psi dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

Sterilisasi Eksplan

Sebelum dilakukan penyemaian biji anggrek, buah anggrek disterilisasi menggunakan metode sterilisasi Handini (2019) dengan cara mencuci seluruh permukaan buah anggrek menggunakan sabun anti bakteri selama 30 menit kemudian dibilas pada air mengalir. Buah anggrek dimasukkan ke dalam *beaker glass* steril dan ditutup menggunakan kertas *aluminium foil*. Di dalam LAFC buah anggrek dicelupkan ke dalam larutan alkohol 96% dan dilewatkan di atas api bunsen.

Penyemaian Biji Anggrek

Buah anggrek steril dibelah menggunakan *scapel* steril hingga terbuka seluruhnya dan terlihat biji anggrek berupa serbuk kuning. Biji anggrek disemai pada media percobaan masing-masingnya sebanyak dua spatula secara merata.

Parameter Pengamatan

Pengamatan waktu munculnya protokorm dilakukan setiap hari hingga protokorm terbentuk. Pengamatan persentase tahap perkecambahan biji dilakukan pada hari terakhir pengamatan. Perkecambahan biji diamati dengan menghitung jumlah total biji di bawah mikroskop stereo dengan menghitung persentase biji yang berhasil mencapai tahap 0 hingga tahap 4.

Persentase tahap perkecambahan biji dihitung dengan menggunakan rumus, jumlah biji pada satu tahap/jumlah total biji x 100%. Tahap perkecambahan biji anggrek pada tahap 0 yaitu biji yang belum berkembang. Tahap 1 saat embrio membengkak namun masih tertutup testa. Memasuki tahap 2 perkecambahan, ukuran embrio bertambah besar sehingga menekan testa hingga mengakibatkan sebagian embrio keluar dari testa. Pada tahap 3 embrio sudah lepas sepenuhnya dari testa dan membentuk struktur bulatan berwarna hijau yang disebut protokorm. Pada tahap 4 terbentuk protokorm dengan calon tunas yang disebut dengan *Shoot Apical Meristem* (SAM) dan calon akar yang disebut *Root Apical Meristem* (RAM) (Rahayu & Mulyani, 2020).

Analisis Data

Data yang didapat dari hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA. Jika analisis data menunjukkan berbeda nyata antar masing-masing perlakuan akan dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan New Multiple Range Test* (DNMRT) dengan taraf 5%.

HASIL

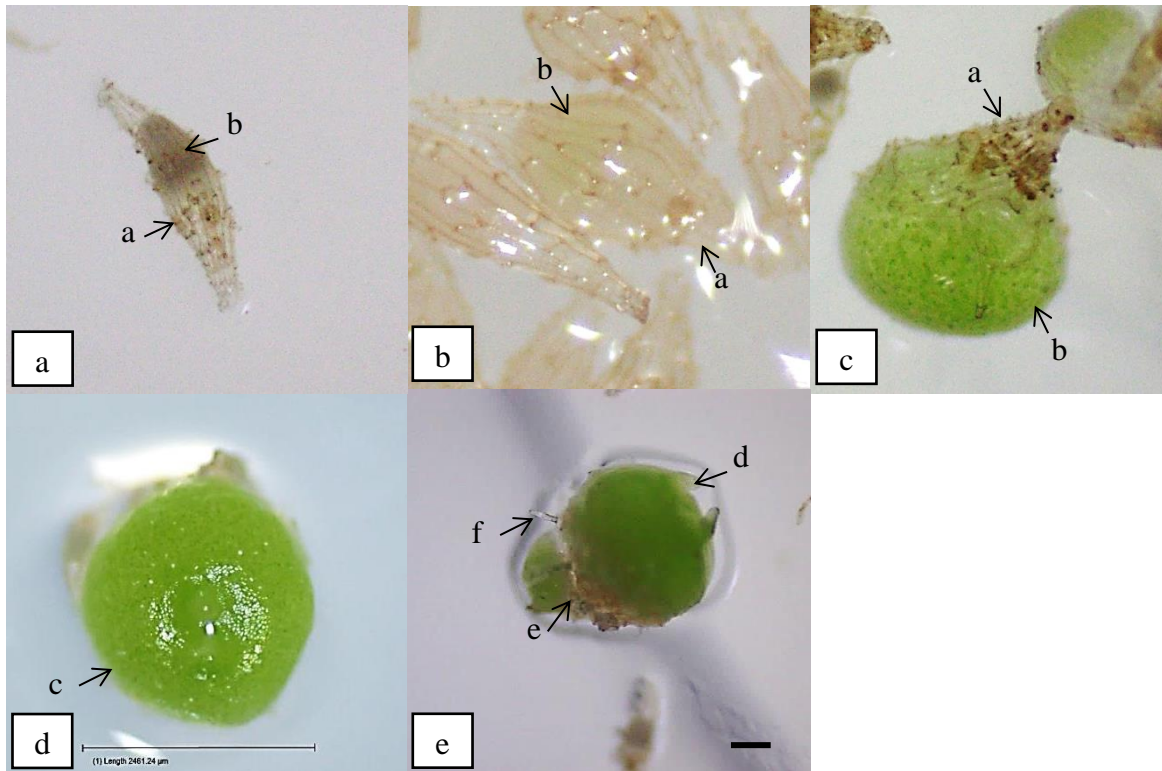
Waktu muncul protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* (Gambar 1) pada beberapa konsentrasi media MS dan penambahan BAP dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil uji DNMRT menunjukkan bahwa penambahan BAP pada media MS berpengaruh nyata terhadap waktu muncul protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*. Penambahan BAP 1 ppm memberikan pengaruh yang sama pada beberapa media dengan pengurangan konsentrasi hara makro.

Hasil penelitian parameter persentase tahap perkecambahan biji anggrek *G. stapeliiflorum* pada beberapa konsentrasi media MS dan penambahan BAP dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1. Pengurangan konsentrasi unsur hara makro dan penambahan BAP pada media MS berpengaruh nyata pada persentase tahap perkecambahan biji anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*.

Tabel 1. Waktu muncul protokorm anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* pada beberapa media tumbuh

Perlakuan	Rata-rata waktu muncul protokorm (HSP)
A. MS penuh	39,25 ^b
B. MS ½ hara makro	41,75 ^{bc}
C. MS ¼ hara makro	45,00 ^c
D. MS penuh+1 ppm BAP	27,00 ^a
E. MS ½ hara makro+1 ppm BAP	28,25 ^a
F. MS ¼ hara makro+ 1 ppm BAP	30,75 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DNMRD pada taraf 5%; Hari Setelah Penyemaian (HSP)



Gambar 1. Tahapan perkecambahan biji anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* pada beberapa konsentrasi media MS selama 12 minggu setelah penyemaian, yaitu tahap 0, biji belum berkecambah, embrio masih terbungkus testa (a); tahap 1, biji belum berkecambah, embrio masih terbungkus testa namun mengalami pembengkakan (b); tahap 2, biji berkecambah, sebagian embrio sudah lepas dari testa, embrio berwarna hijau (c); tahap 3, embrio sepenuhnya terlepas dari testa dan membentuk bulatan penuh berwarna hijau yang disebut sebagai protokorm (d); tahap 4, protokorm membentuk struktur baru pada bagian ujung apikalnya yang disebut sebagai *Shoot Apical Meristem* (SAM) dan *Root Apical Meristem* (RAM) (e); a= testa, b= embrio, c= Protokorm, d= *Shoot Apical Meristem* (SAM), e= *Root Apical Meristem* (RAM), dan f= *Absorbing hair*. Garis= 500 µm

Tahap 0 dan Tahap 1 (Biji Belum Berkecambah)

Persentase biji belum berkecambah pada beberapa konsentrasi media MS dengan penambahan BAP dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil uji DNMRD menunjukkan bahwa beberapa konsentrasi media MS dengan penambahan BAP berpengaruh nyata terhadap persentase biji belum berkecambah. Berdasarkan Tabel 2, rerata persentase biji anggrek belum berkecambah terendah terdapat pada perlakuan MS ¼ hara makro + 1 ppm BAP, sebesar 68,45%. Pengurangan konsentrasi hara makro menjadi ¼ hara makro berpengaruh nyata terhadap persentase biji belum berkecambah. Penambahan

BAP pada media dengan konsentrasi $\frac{1}{4}$ hara makro memberikan persentase biji belum berkecambah lebih rendah dibandingkan pada media dengan konsentrasi penuh dan $\frac{1}{2}$ hara makro.

Tabel 2. Persentase tahap perkecambahan biji anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* pada beberapa media tumbuh selama 12 minggu setelah penyemaian

Perlakuan	Rata-rata persentase tahap perkecambahan biji anggrek <i>G. stapeliiflorum</i> (%)			
	Tahap 0 dan tahap 1 (biji belum berkecambah)	Tahap 2 (biji berkecambah)	Tahap 3 (protokorm)	Tahap 4 (protokorm dengan SAM dan RAM)
MS penuh	97,65 ^c	0,50 ^a	1,85 ^{ab}	0,00 ^a
MS $\frac{1}{2}$ hara makro	98,36 ^c	0,61 ^a	1,03 ^a	0,00 ^a
MS $\frac{1}{4}$ hara makro	96,01 ^c	0,96 ^a	2,53 ^b	0,49 ^b
MS penuh+1 ppm BAP	76,98 ^b	21,77 ^b	1,15 ^a	0,09 ^a
MS $\frac{1}{2}$ hara makro +1 ppm BAP	76,56 ^b	22,08 ^b	1,36 ^{ab}	0,00 ^a
MS $\frac{1}{4}$ hara makro + 1 ppm BAP	68,45 ^a	28,93 ^c	2,62 ^b	0,00 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DNMRMRT pada taraf 5%

Tahap 2 (Biji Berkecambah)

Persentase biji berkecambah pada beberapa konsentrasi media MS dengan penambahan BAP dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil uji DNMRMRT menunjukkan bahwa beberapa konsentrasi media MS dengan penambahan BAP berpengaruh nyata terhadap persentase biji berkecambah. Berdasarkan Tabel 2, rerata persentase biji anggrek berkecambah tertinggi terdapat pada perlakuan MS $\frac{1}{4}$ hara makro + 1 ppm BAP, sebesar 28,93%. Pengurangan konsentrasi hara makro menjadi $\frac{1}{4}$ hara makro berpengaruh nyata terhadap persentase biji berkecambah. Penambahan BAP pada media dengan konsentrasi $\frac{1}{4}$ hara makro memberikan persentase biji berkecambah lebih tinggi dibandingkan pada media dengan konsentrasi penuh dan $\frac{1}{2}$ hara makro.

Tahap 3 (Protokorm)

Persentase protokorm pada beberapa konsentrasi media MS dengan penambahan BAP dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil uji DNMRMRT menunjukkan bahwa beberapa konsentrasi media MS dengan penambahan BAP tidak berpengaruh nyata terhadap persentase protokorm. Berdasarkan Tabel 2, rerata persentase biji anggrek berkecambah tertinggi terdapat pada perlakuan MS $\frac{1}{4}$ hara makro + 1 ppm BAP, sebesar 2,62%. Media dengan konsentrasi $\frac{1}{4}$ hara makro menunjukkan persentase protokorm lebih tinggi dibandingkan perlakuan lain. Media MS $\frac{1}{4}$ hara makro dengan penambahan BAP menghasilkan rerata persentase tertinggi dan diikuti oleh media MS $\frac{1}{4}$ hara makro tanpa penambahan BAP, sebesar 2,53%.

Tahap 4 (Protokorm dengan SAM dan RAM)

Persentase protokorm dengan SAM dan RAM pada beberapa konsentrasi media MS dengan penambahan BAP dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil uji DNMRMRT menunjukkan bahwa beberapa konsentrasi media dengan penambahan BAP berpengaruh nyata terhadap persentase protokorm dengan SAM dan RAM. Berdasarkan Tabel 2, rerata persentase protokorm dengan SAM dan RAM terdapat pada perlakuan MS $\frac{1}{4}$ hara makro, sebesar 0,49%. Perlakuan tunggal berupa pengurangan konsentrasi hara makro menjadi $\frac{1}{4}$ hara makro berpengaruh nyata terhadap persentase protokorm dengan SAM dan RAM. Penambahan BAP pada beberapa konsentrasi media MS memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan lain.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa konsentrasi media MS dengan penambahan BAP memberikan pengaruh nyata terhadap persentase tahap perkecambahan biji anggrek *G.*

stapeliiflorum. Hal ini karena penambahan ZPT BAP dapat merangsang perkecambahan biji anggrek *G. stapeliiflorum*. ZPT BAP merupakan salah satu ZPT golongan sitokinin. Pemberian sitokinin pada masa perkecambahan dapat menstimulasi pembelahan sel dan mendorong perkecambahan biji. Berdasarkan penelitian Lestari et al. (2013) mengenai perkecambahan biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara *in vitro* dengan pemberian 1 mg/L BAP mampu mendukung perkecambahan biji anggrek hingga membentuk protokorm.

Penambahan ZPT golongan sitokinin dapat merangsang perkecambahan biji dengan efek antagonis pada pensinyalan Asam Absisat (ABA). ABA dapat menghambat perkecambahan, sehingga pemberian sitokinin dapat mempercepat waktu perkecambahan biji. Hal ini didukung oleh Guan et al. (2014) yang menyatakan bahwa peningkatan kadar sitokinin dapat menginduksi ekspresi *Arabidopsis response regulator* (ARR) tipe-A (ARR4, ARR5, dan ARR6). Dalam benih yang akan berkecambah, ARR berperan dalam menonaktifkan faktor penghambatan perkecambahan. Di samping itu, sitokinin bekerja dengan meningkatkan transkripsi *gibberellic acid-stimulated Arabidopsis* (GASA6) sehingga dapat menstimulasi perkecambahan (Wang et al., 2021).

Penambahan BAP sebagai ZPT eksogen diduga mampu mendorong perkecambahan dengan mengatur permeabilitas sel pada biji anggrek. Proses perkecambahan salah satunya diatur oleh proses imbibisi air yang masuk ke dalam biji. Pemberian ZPT eksogen mampu membantu penyerapan air oleh biji sehingga biji mulai berkecambah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ningrum et al. (2017) bahwa pemberian hormon eksogen dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesa protein dan permeabilitas sel terhadap air, serta menurunkan tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel dan sel mengalami pertumbuhan. Penambahan ZPT eksogen jenis sitokinin seperti BAP dapat mendorong dimulainya proses perkecambahan biji anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*.

Pada perkecambahan biji tahap 0 hingga tahap 4, Pengurangan hara makro menjadi $\frac{1}{4}$ hara makro dengan penambahan 1 ppm BAP memberikan pengaruh berbeda nyata dengan perlakuan lain. Hal ini disebabkan oleh pengurangan konsentrasi hara makro menjadi $\frac{1}{4}$ hara makro yang ditambah BAP mampu meningkatkan persentase biji yang berkecambah. Utami dan Hariyanto (2019) menyatakan bahwa jenis dan kekuatan media berpengaruh signifikan terhadap tahap perkecambahan biji dan pertumbuhan protokorm. Perkecambahan biji dan perkembangan protokorm sangat dipengaruhi oleh media kultur yang berbeda di antara spesies yang berbeda. Anggrek dengan spesies berbeda memiliki kebutuhan nutrisi dan kecocokan komposisi media berbeda. Penelitian Huh et al. (2016) menemukan bahwa penggunaan media MS $\frac{1}{4}$ hara makro dengan penambahan bahan organik *birch sap* dan *maple sap* berhasil meningkatkan persentase perkecambahan biji anggrek *Cypripedium macranthos*.

Penggunaan media dengan konsentrasi $\frac{1}{4}$ hara makro sudah memenuhi kebutuhan nutrisi pada anggrek *G. stapeliiflorum*. Anggrek *G. stapeliiflorum* diketahui merupakan jenis anggrek yang hidup secara epifit di alam. Huh et al. (2016) menyatakan perkecambahan biji anggrek epifit lebih mudah dibandingkan biji anggrek terestrial. Hal ini terjadi karena biji anggrek terestrial memiliki beberapa karakteristik fisiologis yang tidak menguntungkan yang mengakibatkan perkecambahan menjadi lebih rumit. Biji anggrek terestrial yang sudah matang umumnya memiliki kulit biji yang kaku dan keras dan memiliki hidrofobisitas yang kuat dibandingkan anggrek epifit. Sehingga perkecambahan biji anggrek terestrial cenderung membutuhkan lebih banyak nutrisi untuk menembus membran testa saat memulai perkecambahan. Pada tahap awal perkecambahan, pemberian takaran yang tepat sesuai kondisi fisiologis biji harus diperhatikan. Sehingga penggunaan media MS dengan pengurangan hara makro menjadi $\frac{1}{4}$ konsentrasi optimum merupakan konsentrasi yang tepat dan dapat diserap secara maksimal untuk perkecambahan anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*.

Pengurangan konsentrasi hara makro menjadi $\frac{1}{4}$ hara makro mampu meningkatkan persentase pembentukan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*. Media dengan pengurangan unsur hara makro akan menstimulasi munculnya rekasi stabilitas dari protokorm untuk menghadapi defisiensi hara makro. Pengurangan hara makro menjadi $\frac{1}{4}$ konsentrasi maksimum menyebabkan defisiensi unsur hara N dan K terhadap pertumbuhan protokorm. Defisiensi unsur hara N dan K diduga dapat menstimulasi sintesis hormon endogen yang mendukung pertumbuhan protokorm. Yuan et al. (2019), menjelaskan bahwa kandungan hara makro dalam bentuk unsur Kalium (K^+) dan

Nitrogen (N_2) berperan dalam berbagai pensinyalan dalam pertumbuhan tanaman. Unsur K^+ terakumulasi pada media MS dalam bentuk senyawa *potassium nitrate* (KNO_3) dan *potassium dihydrogen phosphate* (KH_2PO_4). Sedangkan unsur N_2 terakumulasi dalam media MS dalam bentuk senyawa *ammonium nitrate* (NH_4NO_3) dan *potassium nitrate* (KNO_3).

Mekanisme molekular pada pembentukan protokorm menyebabkan ekspresi dari beberapa mi-RNA dan gen yang dimediasi mi-RNA (Li et al., 2021). Transkripsi mi-RNA diketahui memiliki regulasi dengan gen pengkode auksin (*Auxin Respon Factors/ARF*) yang dapat menghambat maupun mengaktifkan ekspresi gen pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Melalui mekanisme ini protokorm anggrek mampu menghadapi defisiensi hara makro dan mensintesis hormon endogen yang berfungsi dalam pertumbuhan dan perkembangan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum*. Lisnandar et al. (2012) menyatakan bahwa penambahan hormon dari luar tidak diperlukan jika tanaman telah memproduksi hormon endogen yang cukup untuk pertumbuhan karena pemberian hormon yang melebihi kebutuhan tanaman diduga dapat menjadi penghambat bagi pertumbuhan tanaman. Hal ini juga didukung pernyataan Ario dan Setiawan (2020), bahwa pengaruh zat pengatur tumbuh eksogen pada media *in vitro* ditentukan oleh kandungan zat pengatur tumbuh endogen yang sama atau berbeda (dalam jaringan tanaman).

Pengurangan hara makro dapat meningkatkan rata-rata persentase protokorm dengan SAM dan RAM. Hal ini karena terbentuknya mekanisme pertahanan alami pada protokorm sehingga protokorm tetap tumbuh meskipun dalam kondisi defisiensi hara makro. Kondisi defisiensi hara makro diketahui dapat menginisiasi pembentukan struktur rambut akar pada tanaman (Nam et al., 2012). Struktur rambut akar yang terbentuk pada perkecambahan biji anggrek tahap 4 dikenal sebagai *absorbing hair*. Pembentukan *absorbing hair* merupakan salah satu bentuk mekanisme pertahanan protokorm dalam kondisi defisiensi unsur hara makro. *Absorbing hair* berfungsi untuk meningkatkan penyerapan nutrisi protokorm sehingga protokorm dapat bertahan dan tumbuh pada keadaan defisiensi hara makro.

Pada pembentukan protokorm dengan SAM dan RAM, perlakuan dengan penambahan BAP menunjukkan persentase terendah dibanding perlakuan lain. Hal ini menunjukkan BAP yang diberikan pada media MS belum mampu membantu pembentukan protokorm dengan SAM dan RAM. Pemberian BAP 1 ppm diduga belum memenuhi kebutuhan untuk pertumbuhan protokorm dengan SAM dan RAM. Persentase biji tahap 0 hingga tahap 3 tertinggi pada perlakuan dengan penambahan BAP. Hal ini menyebabkan kebutuhan sitokinin pada proses perkecambahan biji anggrek tahap 4 juga semakin meningkat dan menyebabkan terjadinya persaingan penyerapan nutrisi antara biji anggrek yang sudah berkecambah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pithaloka et al. (2015) yang menyatakan bahwa kepadatan jumlah tanaman akan memengaruhi persaingan antar tanaman untuk mendapatkan unsur hara.

SIMPULAN DAN SARAN

Penambahan BAP pada media MS memberikan pengaruh nyata dalam mempercepat waktu munculnya protokorm. MS $\frac{1}{4}$ hara makro merupakan media terbaik untuk memperoleh perkembangan anggrek *G. stapeliiflorum* tahap 4 (protokorm dengan SAM dan RAM). Sebagai saran dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui faktor yang mendukung multiplikasi anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti ingin menyampaikan terima kasih kepada Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas yang telah memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian ini.

REFERENSI

- Ario, A., & Setiawan, S. (2020). The effect of benzyl amino purine (bap) concentration on the growth amount of the explant of dendrobium spectabile orchid by in-vitro. *International Journal of Multi Discipline Science (IJ-MDS)*, 3(2). doi: 10.26737/ij-mds.v3i2.2397.
- CITES. (2015). CITES appendices i, ii, and iii. *Journal of Minimal Access Surgery*, 4(3), 85-87.

- Gogoi, K., Kumaria, S., & Tandon, P. (2012). Ex situ conservation of *Cymbidium eburneum* Lindl.: A threatened and vulnerable orchid, by asymbiotic seed germination. *3 Biotech*, 2(4). doi: 10.1007/s13205-012-0062-8.
- Guan, C., Wang, X., Feng, J., Hong, S., Liang, Y., Ren, B., & Zuo, J. (2014). Cytokinin antagonizes abscisic acid-mediated inhibition of cotyledon greening by promoting the degradation of abscisic acid insensitive5 protein in arabidopsis. *Plant Physiology*, 164(3). doi: 10.1104/pp.113.234740.
- Handini, E. (2019). Penyimpanan biji dan mikropropagasi anggrek pensil (*Papilionanthe hookeriana*) di Kebun Raya Bogor. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 5(1), 7-12. doi: 10.13057/psnmbi/m050102.
- Huh, Y. S., Lee, J. K., Nam, S. Y., Paek, K. Y., & Suh, G. U. (2016). Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives. *Journal of Plant Biotechnology*, 43(1), 138-145. doi: 10.5010/JPB.2016.43.1.138.
- Isda, M. N., & Fatonah, S. (2014). Induksi akar pada eksplan tunas anggrek *Grammatophyllum scriptum* var. *citrinum* secara in vitro pada media ms dengan penambahan naa dan bap. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 7(2), 53-57.
- Lestari, E., Nurhidayati, T., & Nurfadhilah, S. (2013). Pengaruh konsentrasi zpt 2,4-d dan bap terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1).
- Li, L., Li, Q., Davis, K. E., Patterson, C., Oo, S., Liu, W., ... Zhang, B. (2021). Response of root growth and development to nitrogen and potassium deficiency as well as microrna-mediated mechanism in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12. doi: 10.3389/fpls.2021.695234.
- Lisnandar, D. S., Mudyantini, W., & Pitoyo, A. (2012). Pengaruh pemberian variasi konsentrasi naa (α -naphthaleneacetic acid) dan 2.4 D terhadap induksi protocorm like bodies (PLB) anggrek macan (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.)). *Bioteknologi*, 9(2). doi: 10.13057/biotek/c090205.
- Nam, Y. J., Tran, L. S. P., Kojima, M., Sakakibara, H., Nishiyama, R., & Shin, R. (2012). Regulatory roles of cytokinins and cytokinin signaling in response to potassium deficiency in arabidopsis. *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0047797.
- Ningrum, E. F. C., Rosyidi, I. N., Puspasari, R. R., & Semiarti, E. (2017). Perkembangan awal protocorm anggrek *Phalaenopsis amabilis* secara in vitro setelah penambahan zat pengatur tumbuh α -naphthaleneacetic acid dan thidiazuron. *Biosfera*, 34(1). doi: 10.20884/1.mib.2017.34.1.393.
- Pithaloka, S. A., Sunyoto, S., Kamal, M., & Hidayat, K. F. (2015). Pengaruh kerapatan tanaman terhadap pertumbuhan dan hasil beberapa varietas sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Jurnal Agrotek Tropika*, 3(1). doi: 10.23960/jat.v3i1.1948.
- Pratama, J. (2018). Modifikasi media ms dengan penambahan air kelapa untuk subkultur i anggrek *Cymbidium*. *Jurnal Agrium*, 15(2). doi: 10.29103/agrium.v15i2.1071.
- Rahayu, E. M. D., & Mulyani, M. (2020). Asymbiotic seed germination and plantlet development of *Dendrobium spectabile* (Blume) Miq. *Buletin Kebun Raya*, 23(1). doi: 10.14203/bkr.v23i1.3.
- Sulichantini, E. D., SusyLOWATI, S., & Ramadhan, A. (2020). Respon morfogenesis eksplan pucuk anggrek tebu (*Grammatophyllum speciosum* Blume) secara in vitro terhadap beberapa konsentrasi kinetin. *AGRIFOR*, 19(2). doi: 10.31293/af.v19i2.4718.
- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2019). In vitro seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm. *Scientifica*, 2019. doi: 10.1155/2019/8105138.
- Wang, M., Gourrierc, J. Le., Jiao, F., Demotes-Mainard, S., Perez-Garcia, M. D., Ogé, L., ... Sakr, S. (2021). Convergence and divergence of sugar and cytokinin signaling in plant development. In *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3). doi: 10.3390/ijms22031282.
- Yuan, W., Suo, J., Shi, B., Zhou, C., Bai, B., Bian, H., ... Han, N. (2019). The barley miR393 has multiple roles in regulation of seedling growth, stomatal density, and drought stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.07.021.