

MATERI PENGELOLAAN LABORATORIUM

PETUNJUK PRAKTIKUM PERKECAMBAHAN BIJI ANGGREK

Oleh :
Paramita Cahyaningrum Kuswandi, M.Sc.

DASAR TEORI

A. Latar Belakang

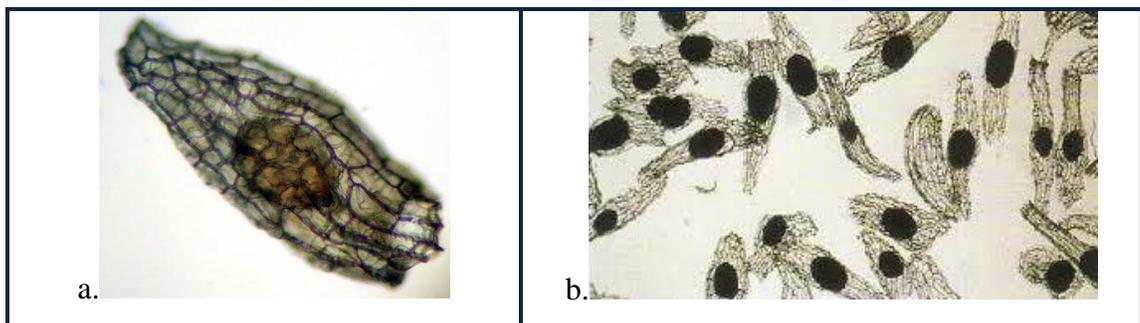
Pada tahun 1909, Bernard secara tidak sengaja menemukan adanya fungi yang penting untuk perkecambahan biji anggrek. Anggrek hidup secara simbiosis dengan fungi sejak perkecambahan. Simbiosis adalah hubungan antara fungi dan akar disebut dengan mikoriza yang berarti fungus-akar. Perkecambahan dan pertumbuhan anggrek yang masih muda sangat tergantung pada hubungan dengan fungi tersebut karena cadangan makanan yang ada pada biji anggrek sangat sedikit. Hadley (1982) menyimpulkan bahwa apa yang diperoleh anggrek dari hasil simbiosis dengan fungi tergantung pada jenis anggrek. Kemungkinan besar biji anggrek memperoleh karbohidrat dan asam amino tertentu. Pada tahun 1920-an, Knudson menunjukkan bahwa perkecambahan biji anggrek dapat dilakukan dengan menanam biji anggrek pada media yang mengandung mineral dan gula sebagai sumber energy (Arditti, 2010). Penelitian yang berhasil dilakukan Knudson menunjukkan bahwa biji anggrek dapat berkecambah secara *in vitro*. Beberapa alasan untuk megecambahkan biji anggrek secara *in vitro* adalah :

1. Biji anggrek sangat kecil dan mengandung cadangan makanan yang sangat sedikit atau bahkan tidak ada. Jika dikecambahkan *in vivo* kemungkinan besar bisa hilang atau cadangan makanan tidak mencukupi
2. Perkecambahan dan perkembangan bibit sangat tergantung pada simbiosis dengan fungi. Jika ditumbuhkan tanpa fungi maka disebut perkecambahan asimbiotik.
3. Jika biji dihasilkan dari persilangan tertentu, maka perkecambahan secara *in vitro* akan meningkatkan persentase keberhasilannya

4. Perkecambahan secara *in vitro* dapat membantu perkecambahan embrio anggrek yang belum berkembang atau belum matang sehingga memperpendek siklus pemuliaannya atau budidayanya
5. Perkecambahan dan perkembangan bibit dapat berlangsung lebih cepat dalam kondisi *in vitro* karena lingkungan yang terkendali dan tidak ada kompetisi dengan fungi atau bakteri yang tidak menguntungkan

B. Biji Anggrek

Menurut Pierik (1987), biji anggrek sangat kecil, biasanya dengan panjang 1.0-2.0 mm dan lebar 0.5-1.0mm. Biasanya per polong atau buah terdapat 1,300-4,000,000 biji anggrek. Biji anggrek terdiri dari testa atau kulit biji yang tebal dan embrio yang terdiri dari sekitar 100 sel (gambar 1).



Gambar 1. Biji anggrek

(sumber : a. www.beyondthehumaneye.blogspot dan b. sukasuka.blogspot.com)

Kulit biji mempunyai sifat yang spesifik yaitu bentuk seperti jaring dengan bentuk yang khas untuk tiap spesies anggrek. Testanya adalah jaringan yang sudah mati dan terdiri dari banyak ruang kosong atau udara sebanyak 96%, sehingga biji anggrek dapat dikatakan seperti suatu balon udara. Embrio anggrek berbentuk bulat atau lonjong. Biji anggrek biasanya tidak bisa dibedakan bagian-bagiannya seperti biji tanaman lain, yaitu tanpa kotiledon, tanpa akar dan tanpa endosperm. Pada ujung distal biasanya terdapat titik tumbuh tetapi sulit untuk diamati.

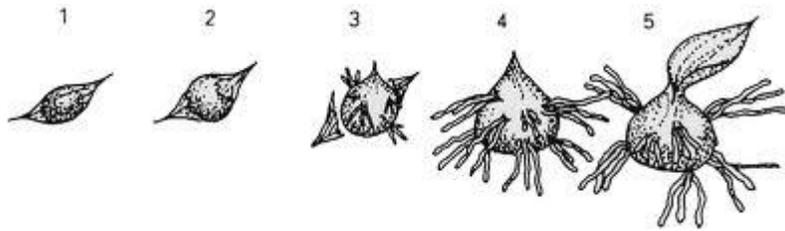
C. Tahap perkecambahan anggrek

Menurut Arditti (1967) dan Harley (1969) *cit.* Pierik (1987), perkecambahan biji anggrek melalui beberapa tahapan yaitu :

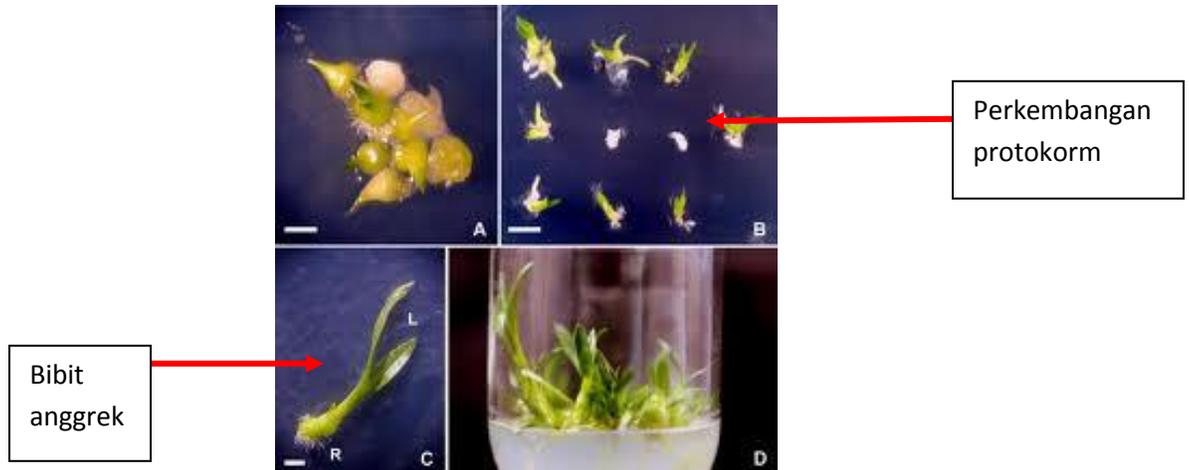
1. Air terimbibisi ke dalam biji melalui testa dan biji terlihat membengkak
2. Setelah pembelahan sel terjadi, embrio keluar dari kulit biji
3. Struktur seperti protokorm (*protocorm like bodies* = plb) terbentuk dari gumpalan sel
4. Meristem tunas dapat dilihat pada plb
5. Terjadi diferensiasi jaringan, terlihat titik tumbuh atau meristem tunas di satu sisi dan meristem akar (rhizoid) di sisi yang lain. Pada saat ini pertumbuhan menjadi lebih cepat
6. Dalam kondisi terang, protokorm menjadi hijau dan lebih banyak daun yang terbentuk. Klorofil juga semakin banyak terbentuk sehingga tanaman menjadi autotrof
7. Akar yang sebenarnya mulai terbentuk dan protokorm serta rhizoid (rambut akar) mulai hilang dan fungsinya digantikan oleh daun dan akar



Gambar 2. Biji anggrek yang sedang berkecambah (sumber : sapphirechild.blogspot)



Gambar 3. Tahapan perkembangan protokorm (sumber : anbg.gov.au)



Gambar 4. Tahap perkembangan protokorm dan bibit anggrek (sumber : sciencedirect.com)

D. Pemilihan dan Sterilisasi Buah Anggrek

Banyak peneliti yang melaporkan bahwa buah anggrek yang dipilih untuk dikedambahkan secara *in vitro* tidak harus yang sudah masak (berwarna kuning kecoklatan) dan sudah membuka atau pecah. Beberapa hal yang perlu diperhatikan saat pemilihan buah anggrek untuk ditanam secara *in vitro* adalah :

1. Lebih mudah untuk sterilisasi buah yang belum pecah
2. Dengan memilih buah yang belum terlalu masak, dapat dilakukan penyelamatan embrio dari hasil persilangan antar spesies atau kultivar yang berkerabat jauh
3. Mengecambahkan biji yang belum terlalu masak dapat memperpendek siklus budidaya

4. Waktu pengambilan buah yang tepat tergantung tiap spesies. Biasanya diambil saat 2/3 masak seperti diungkapkan oleh Lucke (1971) *cit.* Pierik (1987) di tabel 1. Akan tetapi lama perkecambahan tersebut dapat berubah sesuai kultivar maupun lingkungan.

NO.	Jenis anggrek	Waktu buah masak (setelah pembuahan)
1	Calanthe	4 bulan
2	Cattleya	11 bulan
3	Coelogyne	13 bulan
4	Cymbidium	10 bulan
5	Cypripedium	3.5 bulan
6	Dendrobium	12 bulan
7	Epidendrum	3.5 bulan
8	Laelia	9 bulan
9	Milotonia	9 bulan
10	Odontoglossium	7 bulan
11	Paphiopedilum	10 bulan
12	Phalaenopsis	6 bulan
13	Stanhopea	7 bulan
14	Vanda	20 bulan



Gambar 5. Buah anggrek muda (kiri) dan buah anggrek hampir masak (kanan)
(sumber : wordpress.com dan euisnovitasari.blogspot.com)

Sterilisasi dilakukan untuk membersihkan buah anggrek dari mikroorganisme yang dapat mengganggu pertumbuhan biji anggrek saat di kondisi *in vitro*. Sterilisasi buah anggrek biasanya dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan buah yang masih tertutup atau buah yang sudah pecah. Jika buah masih tertutup maka sterilisasi lebih mudah dengan menggunakan alkohol dan buah dibakar di atas api Bunsen. Jika buah sudah pecah maka sterilisasi juga harus dilakukan terhadap biji yang sudah keluar. Metode yang kedua akan lebih rumit karena harus dilakukan sterilisasi basah menggunakan larutan bleach (bayclin) yang dicampur dengan tween untuk membersihkan buah dan biji anggrek.

E. Media Perkecambahan Anggrek Secara *In Vitro*

Perkecambahan anggrek membutuhkan kondisi lingkungan dan nutrisi tertentu terutama jika biji anggrek masih muda. Lingkungan yang mendukung seperti suhu dan cahaya tertentu untuk mematahkan dormansi dan memicu perkecambahan. Nutrisi yang dibutuhkan perlu didukung dengan pemberian nutrisi secara lengkap karena biji anggrek tidak mengandung endosperm atau cadangan makanan untuk membantu pertumbuhan dalam tahap awal sebelum mencapai tahap autotrof. Nutrisi yang harus dipenuhi mencakup senyawa anorganik, sumber

energy (sucrose atau gula pasir), vitamin (misalnya asam nikotinat), pH yang tepat dan agar sebagai bahan pematat. Variasi lain adalah penambahan zat pengatur tumbuh yang dapat digunakan setelah bij berkecambah. Senyawa anorganik juga dapat diganti dengan bahan-bahan lain seperti buah pisang, air kelapa, buah tomat atau air rebusan taoge. Jenis media yang digunakan akan tergantung pada jenis anggrek, umur biji, dan tujuan kultur.

LATIHAN / PRAKTIKUM :

A. OBSERVASI BIJI ANGGREK

Bahan dan Alat :

1. Mikroskop Cahaya
2. Kaca preparat dan tutup
3. Buah anggrek
4. Air
5. Pipet
6. Skalpel

Cara Kerja :

1. Disiapkan mikroskop cahaya dan kaca preparat
2. Buah anggrek dibelah menjadi dua menggunakan skalpel yang bersih/steril

3. Diambil biji angrek dengan ujung skalpel dan diletakkan di atas kaca preparat. Kemudian ditetesi dengan aquadest menggunakan pipet yang bersih dan ditutup dengan cover
4. Preparat diatas dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 4 x 15 (60x) untuk melihat biji angrek secara mengelompok, Akan tampak seperti gambar 1b. diatas.
5. Digambar bentuk biji serta embrio yang tampak didalamnya
6. Perbesaran diubah menjadi 10 x 15 (150x) untuk melihat biji angrek secara individu. Akan tampak seperti pada gambar 1a.
7. Digambar bentuk biji serta embrio dan testa yang tampak pada satu bij iangrek. Perhatikan bentuk testa dan tidak adanya endosperm di dalam biji.

B. PEMBUATAN MEDIA (untuk 1 liter media)

Bahan dan alat :

1. Satu buah pisang ambon (diambil 150g)
2. Air kelapa (150 ml)
3. Gula pasir (20g)
4. Agar (8g)
5. pH meter / pH stick
6. Aquadest
7. Hotplate + magnetic stirrer / kompor + panci kecil + pengaduk
8. Botol-botol steril
9. Autoclave

Cara Kerja :

1. Pisang sebanyak 150g dihaluskan
2. Disiapkan aquadest sebanyak 500ml, dimasukkan ke dalam beaker ukuran 1 liter atau panci kecil jika menggunakan kompor.
3. Ditambahkan pisang yang sudah dihaluskan, air kelapa sebanyak 150ml, dan gula pasir sebanyak 20g
4. Pemanas dan magnet dinyalakan (jika menggunakan magnetic stirrer) atau kompor dan diaduk perlahan sampai gula larut
5. Pemanas atau kompor dimatikan dan diukur pH media. pH seharusnya sekitar 5.8. Jika terlalu basa atau asam maka ditambah HCl atau NaOH untuk mendapatkan pH 5.8
6. Larutan media ditambah aquadest hingga mencapai volume 1 liter
7. Larutan media dipanaskan sampai mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol-botol yang sudah steril.
8. Botol-botol yang sudah diisi media ditutup dan disterilisasi di dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121 C.

C. STERILISASI BUAH ANGGREK

Bahan dan alat :

1. Buah anggrek yang sudah masak (tapi belum pecah)
2. Bunsen
3. Alkohol 70%
4. Pinset
5. Kapas
6. Petridish steril
7. Kertas saring steril

Cara kerja :

1. Buah anggrek dibersihkan / dilap dengan kapas yang sudah dibasahi dengan alkohol 70%. Cara lain adalah dengan mencuci dengan detergen atau sunlight kemudian dibilas dengan air mengalir.
2. Buah anggrek dibawa masuk ke *laminair airflow cabinet* (LAF) dengan petridish steril, pinset steril, alkohol 70% dalam botol, dan bunsen
3. Bunsen dinyalakan di dalam LAF
4. Buah anggrek dicelupkan di dalam alkohol, diangkat sampai sisa alkohol tidak menetes, kemudian dibakar diatas api Bunsen. Dilakukan 3 kali.
5. Buah anggrek siap untuk dibelah dan ditanam bijinya

D. PENANAMAN / PENABURAN BIJI ANGGREK SECARA IN VITRO

Bahan dan alat :

1. Buah anggrek yang sudah steril
2. Media perkecambahan/ media kultur
3. Skalpel steril
4. Petridish steril
5. LAF (*laminair airflow cabinet*)
6. Alkohol 70%

Cara Kerja :

1. Bunsen dinyalakan
2. Buah anggrek yang sudah disterilisasi, dibelah dengan skalpel steril
3. Biji diambil dengan skalpel steril dan ditabur di atas media yang sudah steril
4. Botol media ditutup lagi dan disimpan di rak-rak inkubasi pada suhu 24-26 C.
5. Pengamatan dilakukan pada perkecambahan biji dan perkembangan protokorm anggrek.

DAFTAR PUSTAKA

- Arditti, J. 2010. Plenary Presentation : History of Orchid Propagation. *AsPac J.Mol.Biol.Biotechnol.* Vol 18 (1) Supplement : 171-174.
- Henuhili, V. 2012. *Kultur Jaringan Tumbuhan. Petunjuk Praktikum* FMIPA UNY. Yogyakarta.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands.
- [http.www.anbg.gov.au](http://www.anbg.gov.au). Diakses tanggal 2 Juli 2012.
- [http. www.beyondthehumaneye.blogspot.com](http://www.beyondthehumaneye.blogspot.com). Diakses tanggal 2 Juli 2012.
- [http.www.euisnovitasari.blogspot.com](http://www.euisnovitasari.blogspot.com). Diakses tanggal 2 Juli 2012.
- [http.www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). Diakses tanggal 2 Juli 2012.
- [http.www.sukasuka.blogspot.com](http://www.sukasuka.blogspot.com). Diakses tanggal 2 Juli 2012.
- [http.www.saphirechild.blogspot.com](http://www.saphirechild.blogspot.com). Diakses tanggal 2 Juli 2012.
- [http.www.wordpress.com](http://www.wordpress.com) Diakses tanggal 2 Juli 2012.
- .