

Pertumbuhan Seedling Anggrek Tanah (*Spathoglottis plicata* Blume) *In Vitro* sebagai Respons terhadap Berbagai Komposisi Media MS

In Vitro Seedling Growth of Ground Orchid (*Spathoglottis plicata* Blume) as a Response to Various MS Media Compositions

Made Ria Defiani^{1*}, Ida Ayu Astarini¹, I Made Saka Wijaya¹, Ni Luh Putu Kayika Febryanti¹

Diterima 16 Oktober 2023/ Disetujui 30 April 2024

ABSTRAK

Anggrek tanah (*Spathoglottis plicata* Blume) adalah salah satu spesies anggrek tanah yang bernilai ekonomi dan estetika tinggi dan eksistensi di habitat aslinya termasuk katagori rawan (*vulnerable*). Keberadaan anggrek tanah perlu dipertahankan untuk menjaga sumber plasmanutufah anggrek yang dapat ditanam pada media tanah. Anggrek tanah dapat diperbanyak dengan pemisahan rumpun dan kultur biji melalui kultur jaringan. Penelitian bertujuan mempelajari perkembangan protokorm menjadi *seedlings in vitro* sebagai respons terhadap berbagai konsentrasi garam mineral dalam media MS. Protokorm anggrek berumur 6 MSS (minggu setelah sebar biji) ditanam secara aseptik di media MS dengan 4 variasi konsentrasi garam mineral makro dan mikronya ($\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, MS0 dan MS1 dengan tambahan NAA dan BAP). Percobaan ini dilaksanakan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 10 ulangan. Setiap satuan percobaan terdiri dari satu botol kultur, yang masing-masing berisi 5 *clump* protokorm. Pertumbuhan *seedlings* anggrek terbaik pada umur 6 bulan setelah tanam diperoleh pada media MS0, yang ditunjukkan oleh *seedling* dengan jumlah daun dan tunas terbanyak. Aklimatisasi planlet anggrek tanah juga dilakukan dengan menggunakan media arang sekam di rumah plastik bernaungan.

Kata kunci: BAP, NAA, Aklimatisasi, Protocorm

ABSTRACT

Spathoglottis plicata Blume is a ground orchid which has high economic and aesthetic values. Its existence in natural habitat is classified as vulnerable. Propagation of this orchid *in vitro* can be done by seed germination and seedling growth, which require a suitable culture medium. Murashige and Skoog (MS) has been widely used for *in vitro* seed germination and seedling growth of various orchids. However, the concentration of salts in MS often needs to be adjusted for best results. This study aimed to investigate *in vitro* growth of *S. plicata* seedlings as a response to various MS modification media. Protocorms of 6 weeks after seed sowing were cultured on MS modification media, namely, $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, MS0 and MS with addition of NAA and BAP. Treatments were arranged in a completely randomized design with 10 replications, each of which consisted of one culture vessel containing 5 clumps of protocorms. After six months in the treatment media, it was found that MS0 was the best medium for *in vitro* seedling growth, showing the highest leaf numbers and number of seedlings. After 4 weeks *ex vitro*, 13% of plantlets survived when acclimatized in a plastic shade house using rice-husk charcoal medium.

Keywords: BAP, NAA, acclimatization, protocorm

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana
Jl. Raya Kampus Unud, Bukit Jimbaran, Kuta Selatan, Badung, Bali 80361, Indonesia
E-mail: maderia@unud.ac.id (*penulis koresponden)

PENDAHULUAN

Anggrek tanah *Spathoglottis plicata* Blume tergolong tanaman berbunga yang dapat tumbuh pada media tanah di alam. Penampilan tanaman anggrek tanah sangat menarik sebagai penghias kebun di halaman rumah atau tanaman hias dalam pot karena memiliki morfologi daun seperti helaian jarum dan bentuk bunga yang menarik. Variasi yang beragam pada morfologi tanaman (daun, tangkai bunga dan jumlah bunga) menjadikan anggrek tanah dapat digunakan untuk proses seleksi dalam membentuk sifat unggul tertentu (Effendie, 2005; Nugroho *et al.*, 2018). Persilangan antar sesama jenis anggrek ini, baik secara alami maupun secara buatan menghasilkan variasi warna bunga mulai dari ungu hingga merah muda dengan masa mekar bunga cukup lama. Setiap kuntum bunga yang mekar akan menghasilkan buah berbiji yang dapat dipakai sebagai sumber eksplan dalam perbanyakan tanaman melalui perkecambahan biji secara *in vitro* (Aloysius *et al.*, 2017).

Anggrek tanah dapat diperbanyak secara vegetatif melalui pemisahan rumpun dan generatif melalui kultur biji (McConnell, 2019). Biji anggrek berukuran sangat kecil (diameter 0.1 mm), dan hanya terdiri dari embrio, tidak memiliki endosperm. Ketika dikecambahkan, embrio dalam biji anggrek akan membesar, membentuk struktur mirip *corm* yang disebut protokorm (George, 2008). Media yang digunakan untuk perbanyakan anggrek melalui biji mengandung nutrisi yang dilengkapi oleh sukrosa dan zat pengatur tumbuh. Formulasi media Murashige dan Skoog (MS) merupakan media umum yang dipakai dalam kultur jaringan (Murashige dan Skoog, 1962). Media MS dapat dikombinasikan dengan auksin dan sitokinin untuk mendukung pertumbuhan tanaman. Perbanyakan *in vitro* anggrek tanah *S. plicata* melalui perkecambahan biji *asymbiotic* sudah dilakukan dengan menggunakan berbagai media dan zat pengatur tumbuh (Aswathi *et al.*, 2017).

Medium Murashige dan Skoog *full strength* (MS0) merupakan medium yang paling banyak digunakan untuk perbanyakan anggrek. Medium MS untuk perbanyakan *Dendrobium* secara *in vitro* ditemukan sebagai yang terbaik. Perkecambahan biji anggrek *Vanda tessellata* terbaik juga dicapai ketika ditumbuhkan pada medium MS0 (Reddy, 2016). Selain MS0, penggunaan medium $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{4}$ MS juga digunakan untuk pertumbuhan anggrek. Ragu *et al.* (2022), melaporkan bahwa modifikasi media MS dengan pengurangan konsentrasi hara makro dan mikro menjadi setengahnya ($\frac{1}{2}$ MS) sesuai untuk perkecambahan biji anggrek *Paphiopedilum lowii* dan perkembangan protokorm menjadi seedling. Park *et al.* (2023) juga mendapatkan bahwa penambahan NAA ke dalam media $\frac{1}{2}$ MS dapat meningkatkan perkecambahan biji dan perkembangan protokorm menjadi seedling pada anggrek *Cypripedium guttatum*. Selain itu, penggunaan medium $\frac{1}{4}$ MS dengan penambahan arang aktif baik digunakan untuk pertumbuhan anggrek *Vanda helvola* meskipun terdapat

pengurangan komposisi dan tanpa penambahan ZPT eksogen (Wasiati *et al.*, 2021).

Aklimatisasi diperlukan untuk proses adaptasi planlet dari lingkungan *in vitro* ke lingkungan eksternal (*ex-vitro*). Jenis media aklimatisasi mempengaruhi keberhasilannya. Media yang terbuat dari ampas tebu dan sabut kelapa untuk aklimatisasi dapat mendukung keberhasilan pertumbuhan anggrek (*Dendrobium sylvanum* Rchb. f.) (Hariyanto *et al.*, 2019). Aklimatisasi planlet anggrek *Dendrobium nobile* menggunakan media campuran yang mengandung *cocopeat*: pasir gurun: *perlite* pada rasio 1.0:1.0:0.2 (v/v/v) dapat meningkatkan keberhasilan hidup planlet hingga 100% setelah 120 hari transplantasi. Selanjutnya, penambahan serpihan kayu dan kulit kayu ke substrat tersebut sebagai lapisan atas akan dapat mendukung perbanyakan tanaman anggrek (Mirani *et al.*, 2017). Kombinasi media tanam juga dapat berasal dari paku-pakuan dan arang kayu atau paku-pakuan dan batu bata untuk aklimatisasi planlet *Dendrobium* (Nasution *et al.*, 2020).

Penelitian ini bertujuan mempelajari perkembangan protokorm menjadi *seedlings in vitro* sebagai respons terhadap berbagai konsentrasi garam mineral dalam media MS atau penambahan medium dasar MS dengan NAA dan BAP.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai dengan Desember 2021 di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Udayana. Bahan tanaman berupa buah anggrek tanah berasal dari petani di Desa Batusesa, Bedugul, Kabupaten Tabanan, Bali. Buah anggrek tersebut diambil kurang lebih 2.5-3 bulan sejak terjadi pembuahan, kondisi buah masih utuh dan kulit buah masih berwarna hijau.

Rancangan acak lengkap (RAL) digunakan dalam penelitian dengan satu faktor yaitu media MS dengan beberapa konsentrasi garam mineral. Tahap persemaian biji anggrek hanya menggunakan media MS0 (Murashige and Skoog berkonsentrasi garam mineral penuh atau *full-strength*) (Murashige dan Skoog, 1962). Setelah protokorm tumbuh dilakukan subkultur ke media MS0 dengan komposisi $\frac{1}{4}$ MS0, $\frac{1}{2}$ MS0, 1 MS0 dan MS 1 (MS dengan tambahan 0.5 ppm NAA dan 3 ppm BAP). Setiap perlakuan diulang sebanyak 10 ulangan. Setiap satuan percobaan terdiri satu botol kultur, yang masing-masing berisi 5 *clump* protokorm dengan ukuran diameter ± 0.3 cm.

Pembuatan Medium MS0, $\frac{1}{4}$ MS0 dan $\frac{1}{2}$ MS0

Gelas ukur volume 1,000 mL disiapkan, kemudian diisi dengan ± 400 mL akuades. Medium MS dengan vitamin (PhytoTech Labs) sebanyak 4.43 g ditimbang untuk membuat 1 L media MS0, kemudian ditambahkan sukrosa 30 g, dan ditambahkan akuades hingga 1 L. Gelas ukur volume 1,000 mL disiapkan, kemudian diisi dengan ± 400 mL akuades. Medium

MS dengan vitamin sebanyak 2,215 g ditimbang untuk membuat 1 L media $\frac{1}{2}$ MS, kemudian ditambahkan sukrosa 15 g, dan ditambahkan akuades hingga 1 L. Gelas ukur volume 1,000 mL disiapkan, kemudian diisi dengan \pm 400 mL akuades. Medium MS dengan vitamin sebanyak 1.1075 g ditimbang untuk membuat 1 L media $\frac{1}{4}$ MS, kemudian ditambahkan sukrosa 7.5 g, dan ditambahkan akuades hingga volume menjadi 1 L.

Masing-masing medium MS0, $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{4}$ MS dihomogenkan. Setelah semua bahan larut, pH masing-masing larutan ditera sampai pH menunjukkan nilai 5.5-5.7. Jika larutan media terlalu asam, maka larutan ditambah beberapa tetes KOH 0.1 N. Jika larutan terlalu basa, maka larutan ditambah HCl 0.1 N. Setelah pH larutan sesuai, lalu ditambahkan bubuk agar-agar (Bioagar) sebanyak 6 g dan dimasak (dipanaskan) sampai semua agar-agar larut. Setelah itu, 20 mL medium dimasukkan ke botol kultur berkapasitas 100 mL, kemudian ditutup rapat dengan aluminium foil dan diberi label. Sterilisasi media kultur menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121 °C, dan tekanan 15 psi.

Medium MS0 dengan Penambahan Auksin dan Sitokinin (MS1)

Gelas ukur volume 1,000 mL disiapkan, kemudian diisi dengan \pm 400 mL akuades. Medium MS dengan vitamin ditimbang sebanyak 4.43 g untuk membuat 1 L medium, kemudian ditambahkan sukrosa 30 g dan 5 mL larutan stok NAA dan 30 mL larutan stok BAP (konsentrasi larutan stok NAA dan BAP adalah 100 ppm). Larutan kemudian dihomogenkan dengan akuades hingga volume 1 L. Setelah semua bahan larut, pH larutan ditera sampai mencapai nilai 5.5-5.7. Lalu ditambahkan agar-agar (Bioagar) sebanyak 6 g dan dimasak (dipanaskan) sampai semua agar larut. Setelah itu, 20 mL medium dimasukkan ke botol kultur berkapasitas 100 mL, kemudian ditutup rapat dengan aluminium foil dan diberi label. Sterilisasi media kultur menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121 °C, 15 psi.

Kultur Biji Anggrek pada Media MS0

Buah anggrek tanah dicuci bersih dengan air mengalir, lalu dikeringkan dan disemprot dengan alkohol 70% sebelum dimasukkan ke *laminar air flow cabinet* (LAFC). Sterilisasi di dalam LAFC dilanjutkan dengan mencelup buah anggrek dalam alkohol 70% lalu dilewatkan di atas nyala api bunsen selama 30 detik dan ditunggu hingga nyala api padam. Aktivitas ini dilakukan sebanyak tiga kali, buah tersebut diletakkan dalam cawan petri steril dan buah siap dibelah dengan pisau steril. Biji anggrek dikeluarkan dari dalam buah dan ditaburkan ke atas media MS0. Selanjutnya kultur tersebut disimpan di ruang inkubasi dengan penyinaran lampu fluoresens pada kuat penerangan \pm 1,000 lux, dan fotoperiodisitas 16 jam terang dan 8 jam gelap.

Subkultur Protokorm ke Media $\frac{1}{4}$ MS0, $\frac{1}{2}$ MS0, MS0 dan MS1

Protokorm yang tumbuh pada media MS0 berumur 6 minggu setelah semai disubkultur pada berbagai media MS dengan berbagai konsentrasi garam mineral atau MS + 0.5 ppm NAA dan 3 ppm BAP. Selanjutnya kultur tersebut disimpan di ruang tumbuh dengan penyinaran dan fotoperiodisitas sebagaimana pada perkecambahan biji.

Aklimatisasi Planlet

Planlet diaklimatisasi pada umur 6 bulan setelah eksplan disubkultur ke media perlakuan. Arang sekam digunakan sebagai media aklimatisasi. Adaptasi botol kultur ke suhu ruang selama 14 hari dilakukan untuk *hardening off* planlet sebelum planlet dikeluarkan dari botol. Botol kultur yang berisi planlet ditambahkan air sedikit lalu botol dikocok perlahan untuk melonggarkan posisi akar planlet dari media agar. Planlet dikeluarkan secara hati-hati dari botol kultur, lalu dicuci bersih dari media kultur yang menempel, selanjutnya planlet direndam dalam larutan fungisida Dithane M-45 pada konsentrasi 2 g L⁻¹. Selanjutnya, planlet dibungkus dengan sabut kelapa halus yang sudah disterilkan lalu ditanam ke media sekam bakar lalu diletakkan di rumah plastik bernaungan untuk melihat persentase planlet yang mampu bertahan hidup di lingkungan *ex vitro* selama 4 minggu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkecambahan biji menjadi Protokorm

Pada kultur biji berumur 1 bulan setelah semai, biji anggrek *S. plicata* yang disemai di media MS0 berhasil tumbuh atau berkecambah menjadi protokorm pada media MS0 (Gambar 1).

Hal ini menunjukkan bahwa untuk perkembangan protokorm dari biji anggrek memerlukan media MS yang mengandung unsur hara makro, mikro, vitamin dan mio-inositol serta sukrosa pada konsentrasi 30 g L⁻¹. Raynalta dan Sukma (2013) menyatakan bahwa perbanyak anggrek *Phalaenopsis amabilis* melalui perkecambahan biji *in vitro* diperoleh kemampuan hidup protokorm paling tinggi dengan komposisi media $\frac{1}{2}$ MS yang diperkaya dengan 15% air kelapa.

Biji yang sudah berkecambah menjadi protokorm di subkultur ke media perlakuan untuk melihat perkembangan protokorm tersebut menjadi *seedling* pada berbagai media MS yang konsentrasi garam mineralnya dan sukrosanya dimodifikasi atau pada media dasar MS ditambahkan NAA dan BAP. Komposisi media MS0 yang berbeda memberikan perbedaan pertumbuhan *seedling S. plicata*. Media $\frac{1}{4}$ MS0 dan $\frac{1}{2}$ MS0 menunjukkan pertumbuhan yang lebih cepat, kemungkinan karena protokorm masih berukuran kecil dan nutrisi yang diperlukan masih sedikit.

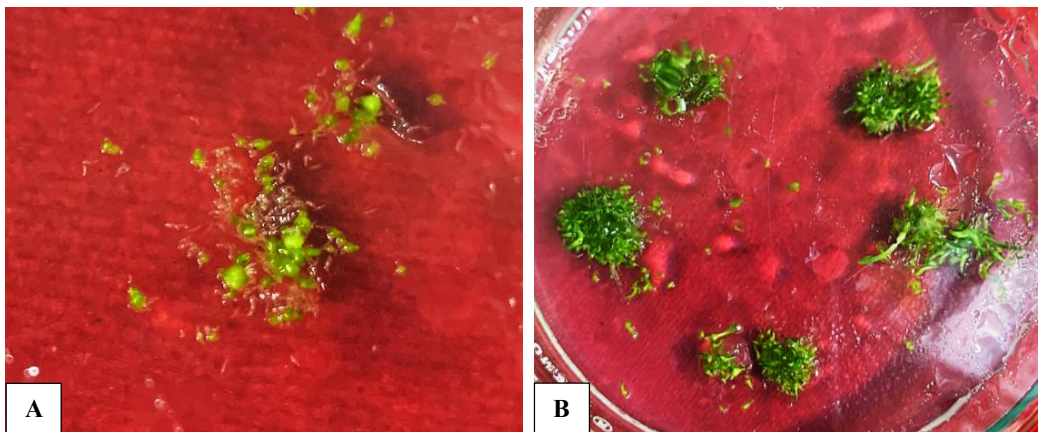
Pertumbuhan dan Perkembangan Protokorm menjadi *Seedling*

Protokorm umur 6 MSS disubkultur ke media ¼ MS0, ½ MS0, MS0 dan media MS1 (MS 0 dengan penambahan 0.5 ppm NAA dan 3 ppm BAP). Berdasarkan hasil pengamatan kuantitatif, pada umur 6 bulan setelah subkultur pertumbuhan protokorm menjadi *seedling* anggrek tanah di media MS0 menunjukkan rata-rata jumlah anakan dan jumlah daun terbanyak dibandingkan dengan media MS yang lain, yaitu ¼ MS0, ½ MS0 dan MS1 (Tabel 1). Hal ini diduga disebabkan oleh kemampuan protokorm tersebut untuk tumbuh dan berkembang menjadi *seedling* sudah cukup dengan menggunakan komposisi media MS0 dan hormon endogen yang ada di dalam *seedling*, sehingga penambahan ZPT akan menghambat pertumbuhan eksplan. Di samping itu, pengurangan konsentrasi hara mineral, vitamin dan juga sumber energi dalam bentuk sukrosa menjadi setengah (15 g L⁻¹) dan seperempat (7.5 g L⁻¹) dari MS0 yang mengandung 30 g L⁻¹ kemungkinan menjadi penyebab terhambatnya

pertumbuhan *seedling*. Romeda *et al.* (2015) melaporkan bahwa jumlah protokorm *S. plicata* terbaik diperoleh pada media MS yang dimodifikasi dengan vitamin B5 dan sukrosa 30 g L⁻¹ tanpa penambahan ZPT eksogen (Romeida *et al.*, 2015). Pertumbuhan jumlah tunas dan jumlah daun per tunas dapat dilihat pada Tabel 1.

Aklimatisasi Planlet Anggrek Tanah

Planlet dari semua komposisi MS diaklimatisasi secara bersamaan pada satu jenis media, namun pengambilan data pengamatan tidak membedakan komposisi media asal planlet. Media arang sekam yang digunakan untuk proses aklimatisasi planlet belum optimal karena planlet yang mampu tumbuh hanya 12% pada umur 1 bulan setelah aklimatisasi (Tabel 2). Hal ini disebabkan oleh kondisi planlet masih dalam keadaan yang kurang vigor sehingga kemampuan adaptasi terbatas. Penurunan jumlah tersebut disebabkan juga oleh serangan jamur di bagian pangkal tunas sehingga daun menjadi kuning dan rontok.



Gambar 1. Penampilan kluster protokorm hasil perkecambahan biji anggrek *S. plicata* di media MS0: A. umur 4 MSS, B. umur 8 MSS

Tabel 1. Pertumbuhan dan perkembangan protokorm pada media MS0 dan MS1

Jenis media	Jumlah tunas	Jumlah daun/tunas	Tinggi tunas (cm)	Jumlah akar	Panjang akar
¼ MS0	1.0 ^a	4.8 ^b	7.6 ^b	5.6 ^{cd}	7.3 ^c
½ MS0	0.8 ^{ab}	3.5 ^a	14.2 ^d	6.0 ^d	4.8 ^b
MS0	1.4 ^b	5.4 ^b	9.8 ^c	3.6 ^a	1.6 ^a
MS1	1.0 ^a	3.5 ^a	4.1 ^a	4.5 ^{ab}	4.5 ^b

Keterangan: Uji lanjut menggunakan DMRT 5%

Tabel 2. Hasil aklimatisasi anggrek tanah

Pengamatan minggu ke-	Jumlah Plantlet	Persentase planlet hidup
I	80	94.11%
II	30	35.29%
III	27	31.76%
IV	11	12.94%

Di dalam rumah kaca, tahap aklimatisasi dilakukan bertahap dengan cara menurunkan kelembaban relatif menggunakan semprot butiran air dan meningkatkan intensitas cahaya menggunakan teknik shading. Cara *fogging* dalam aklimatisasi dapat meningkatkan kelangsungan hidup *ex vitro* tanaman *Dendrobium* yang diproduksi secara *in vitro* (da Silva *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Anggrek tanah *Spathoglottis plicata* dapat diperbanyak secara aseptik melalui perkecambahan biji dan perkembangan protokorm menjadi seedling *in vitro* di media MS tanpa penambahan ZPT. Pertumbuhan protokorm menjadi seedling di media MS0 menghasilkan rata-rata jumlah tunas dan jumlah daun terbanyak dibandingkan dengan komposisi MS yang lain. Namun, pada media ½ MS, tinggi tanaman dan jumlah akar lebih besar dan pada media ¼ MS dihasilkan panjang akar yang lebih panjang daripada akar planlet dengan komposisi MS lainnya. Pada umur 4 minggu setelah aklimatisasi, planlet di media arang sekam *ex vitro* menghasilkan keberhasilan hidup planlet hanya sebesar 13%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian dibiayai oleh DIPA PNBP Universitas Udayana TA-2021 sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Penelitian Nomor: B/96-305/UNT14.4.A/PT.01.05/2021 tanggal 3 Mei 2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Aloysius, S., A. Purwantoro, K. Dewi, E. Semiarti. 2017. Improvement of genetic variability in seedlings of *Spathoglottis plicata* orchids through x-ray irradiation. Biodiversitas. 18(1): 20-27. Doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d180104>
- Aswathi, A., S. Shibu, A. Gopinath, A. Mohan. 2017. In vitro propagation of *Spathoglottis plicata* Blume via asymbiotic seed germination. Int. J. Adv. Res. 5(3): 431-438. Doi: <https://doi.org/10.21474/IJAR01/3530>
- da Silva, T., J.A., M.M. Hossain, M. Sharma, J. Dobránszki, J.C. Cardoso, Z. Songjun. 2017. Acclimatization of in vitro-derived *Dendrobium*. Hort. Plant J. 3(3): 110-124. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>
- George, E.F., M.A. Hall, G.J.D. Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture (Volume 1. The Background). Springer, The Netherlands. 1: 1-28. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1
- Hariyanto, S., A.R. Jamil, H. Purnobasuki. 2019. Effects of plant media and fertilization on the growth of orchid plant (*Dendrobium sylvanum* Rehb. F.) in acclimatization phase. Planta Tropika. 7(1): 66-72. Doi: <https://doi.org/10.18196/pt.2019.095.66-72>
- McConnell, J. 1996. Two tropical plants as plant materials for teaching seed germination. Hort. Science. 31(4). Doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.4.650a>
- Mirani, A.A., A.A. Abdul-Soad, G.S. Markhand. 2017. Effect of different substrates on survival and growth of transplanted orchids (*Dendrobium nobile*) into net house. International Journal of Horticulture and Floriculture. 5(4): 310-317.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nasution, L.Z., M. Hasibuan, E.D. Manurung. 2020. adaptability of tissue-cultured *Dendrobium* orchid planlets on planting media and its position during acclimatization process. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 454(1). Doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/454/1/012166>
- Nugroho, G.D., W.I., Aditya, D. Kristina, Suratman. 2018. Keanekaragaman anggrek (*Orchidaceae*) di taman nasional gunung Merbabu (TNGMb), Jawa Tengah. Prosem Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia.
- Park, H.B., J. An, K.H. Bae, S.H. Hong, H.J. Park, S. Kim, C.W. Lee, B.D. Lee, J.H. Baek, N.Y. Kim, J. E. Hwang. 2023. Asymbiotic Seed Germination and In Vitro Seedling Development of the Endangered Orchid Species *Cypripedium guttatum*. Plants. 12(22): 3788. Doi: <https://doi.org/10.3390/plants12223788>.
- Reddy, J. 2016. Nutrient media used for micropropagation of Orchids: A research review. World J. Pharm. Res. 5(9): 1719-1732.
- Ragu, V.S., R. Ombokou, R. Repin, D. Molidin, R. Miadin, Z.A. Aziz. 2022. In vitro seed germination of *Paphiopedilum lowii*, an endangered slipper orchid in North Borneo. Biodiversitas. 23(11): 5687-5694. Doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d231119>
- Raynalta, E., D. Sukma, 2013. Pengaruh komposisi media dalam perbanyakan *protocorm like bodies*, pertumbuhan planlet, dan aklimatisasi *Phalaenopsis amabilis*. J. Hort. Indonesia. 4(3): 131-139. Doi: <https://doi.org/10.29244/jhi.4.3.131-139>

- Romeida, A., S.H. Sutjahjo, A. Purwito, D. Sukma, Rustikawati. 2015. Optimasi pertumbuhan dan multiplikasi lini klon plbs anggrek *Spathoglottis plicata* Blume melalui modifikasi komposisi medium MS dan sitokinin. J. Hort. Indonesia. 4(1): 1-8. Doi: <https://doi.org/10.29244/jhi.4.1.1-8>
- Suskandari, K, K. Effendie. 2005. Keragaman genetik plasma nutfah anggrek *Spathoglottis*. J. Hort. 15(4): 260-269.
- Wasiati, A.R, I.A Nugraheni, Y. Setiawati. 2021. The combination of murashige and skoog (MS) media and activated charcoal on the growth of the *Vanda helvola* orchid plant in vitro. Int. J. Health Sci. Tech. 3(1): 159-170. Doi: <https://doi.org/10.31101/ijhst.v3i1.2247>