

PENGARUH PENAMBAHAN PEPTON DALAM MEMPERCEPAT PERKECAMBAHAN *Grammatophyllum stapeliiflorum* J.J. Smith SECARA IN VITRO

EFFECT OF ADDING PEPTONE IN ACCELERATING GERMINATION OF *Grammatophyllum stapeliiflorum* J.J. Smith IN VITRO

Media, Zozy Aneloi Noli* dan Suwirmen

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas

* Corresponding Author. E-mail address: zozynoli@sci.unand.ac.id

PERKEMBANGAN ARTIKEL:

Diterima: 11 Agustus 2023

Direvisi: 14 September 2023

Disetujui: 27 November 2023

KEYWORDS:

Embryo, *Grammatophyllum stapeliiflorum*, peptone, germination

KATA KUNCI:

Embryo, *Grammatophyllum stapeliiflorum*, pepton, perkecambahan

ABSTRACT

Grammatophyllum stapeliiflorum is listed in Appendix II of the CITES. The population of this orchid has decreased due to human activities and germination in nature is low. The tissue culture technique is one solution for propagating orchids using seeds as a source of explants. Pepton is an organic compound that can increase germination and protocorm development because containing amino acid, protein biotin, pyridoxine, thiamin and nitrogen. The research was conducted to determine the effect of peptone on seed germination and protocorm development of *G. stapeliiflorum* through tissue culture technique. The method used a Completely Randomized Design (CRD) with 6 treatments and 4 replications. The mature seed from sterilized capsule was sown on MS medium without peptone as a control treatment and added with various concentrations of peptone (0.5; 1; 1.5; 2; and 2.5 g/L). The statistical analysis results showed that peptone had a significant effect in accelerating germination. The highest percentage of seed germination (88.59%), protocorm formation (61.02%), and protocorm with SAM and RAM (22.43%) was observed in MS medium containing 2 g/L peptone.

ABSTRAK

Grammatophyllum stapeliiflorum termasuk kedalam daftar appendix II CITES. Populasi anggrek ini menurun disebabkan karena aktivitas manusia dan tingkat perkecambahan yang rendah di alam. Teknik kultur jaringan merupakan salah satu solusi perbanyak anggrek menggunakan biji sebagai sumber eksplan. Pepton merupakan senyawa organik yang bisa meningkatkan perkecambahan dan perkembangan protokorm karena mengandung asam amino, protein biotin, piridoksin, tiamin dan nitrogen. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pepton terhadap perkecambahan biji dan perkembangan protokorm *G. stapeliiflorum* melalui teknik kultur jaringan. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Biji yang sudah matang dari kapsul steril ditaburkan pada media MS tanpa pepton sebagai perlakuan kontrol dan dengan penambahan berbagai konsentrasi pepton (0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 g/L). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pepton memiliki pengaruh yang signifikan dalam mempercepat perkecambahan. Persentase tertinggi perkecambahan biji (88,59%), pembentukan protokorm (61,02%) dan protokorm yang memiliki SAM dan RAM (22,43%) diamati pada media MS yang mengandung 2 g/L pepton.

1. PENDAHULUAN

Anggrek dapat tumbuh dengan baik dinegara yang memiliki iklim tropis seperti Indonesia. Anggrek memiliki nilai estetika dengan bentuk bunga yang beragam serta menarik untuk dikoleksi. Hal ini mengakibatkan tingginya nilai jual anggrek (Fandani *et al.*, 2018). Di dunia terdapat sekitar 25.000 jenis anggrek, sekitar 5000 jenis tersebar di wilayah Indonesia (Purwanto, 2016). Salah satu jenis anggrek yang terdapat di pulau Sumatera adalah *Grammatophyllum stapeliiflorum*. Anggrek ini disebut juga dengan nama anggrek sendu.

Anggrek *G. stapeliiflorum* sudah sulit ditemukan di habitat aslinya dikarenakan kerusakan habitat dan perburuan liar (Isda & Fatonah, 2014). Anggrek *G. stapeliiflorum* termasuk ke dalam daftar Appendix II CITES (*Convention on International Trades on Endangered Species of Wild Flora and Fauna*). Hal itu menandakan bahwa anggrek *G. stapeliiflorum* tidak terlalu terancam punah tetapi perdagangannya perlu dibatasi agar tidak mengganggu kelangsungan hidup anggrek tersebut (CITES, 2017).

Perkecambahan anggrek di alam relatif rendah yakni kurang dari 5% (Vudala dan Ribas, 2017). Hal ini disebabkan karena tidak adanya endosperm pada biji. Endosperm merupakan sumber nutrisi yang dibutuhkan untuk perkembangan embrio. Perkecambahan anggrek secara alami membutuhkan simbiosis dengan mikoriza. Perkecambahan anggrek di alam memiliki tingkat keberhasilan yang rendah sehingga perkecambahan secara *in vitro* lebih sering digunakan karena lebih mudah dan menguntungkan (Huh *et al.*, 2016). Perkecambahan secara *in vitro* dilakukan dengan cara menyemai biji anggrek pada media yang mengandung nutrisi yang sesuai untuk pertumbuhan anggrek.

Menurut Isda dan Fatonah (2014), media MS dan MS setengah komposisi lebih cocok digunakan untuk media perkecambahan biji. Media MS sering digunakan dalam kultur jaringan karena mengandung hampir semua unsur yang dibutuhkan oleh tanaman (Silalahi, 2015). Pada Media MS terdapat nitrogen dalam bentuk amonium nitrat (NH_4NO_3). Amonium nitrat merupakan jenis nitrogen yang optimum untuk perkembangan dan pertumbuhan biji anggrek *Dendrobium lanxiflorum* secara *in vitro* (Mukaromah *et al.*, 2013). Penggunaan media VW untuk perkecambahan anggrek *Grammatophyllum* sp. menghasilkan persentase terbentuknya protokorm yang rendah yaitu sekitar 3% (Kartikaningrum *et al.*, 2017).

Penambahan senyawa organik juga diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan perkecambahan anggrek secara *in vitro*. Beberapa senyawa organik yang dapat digunakan diantaranya pepton, yeast, air kelapa maupun homogenat seperti pisang, jagung dan tomat (Tharapan *et al.*, 2014). Pada penelitian ini senyawa organik yang digunakan adalah pepton. Pepton merupakan sumber nitrogen yang berperan penting dalam perkecambahan biji (Utami *et al.*, 2017).

Persentase perkecambahan maksimum anggrek *Phalaenopsis* terjadi pada media MS yang diberi 1 g/L pepton yaitu sebesar 94,7%, dan pada media MS setengah komposisi yang mengandung 1 g/L dan 2 g/L pepton masing-masing sebesar 90,0% dan 91,7% (Abbazsadeh *et al.*, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Shekarriz *et al.* (2014) menunjukkan bahwa penambahan 2 g/L pepton yang dikombinasikan dengan 15% air kelapa pada media VW menghasilkan persentase perkecambahan anggrek hibrid *Phalaenopsis* 'Manchester' tertinggi yaitu sebesar 74,5%. Pada anggrek *Grammatophyllum speciosum* persentase perkecambahan tertinggi terjadi pada media MS yang mengandung 1,5 g/L pepton sebesar 70%, dan persentase terendah pada perlakuan kontrol sebesar 4,5% (Alimah, 2020). Berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa penambahan senyawa organik berupa pepton pada media kultur dapat meningkatkan keberhasilan perkecambahan anggrek.

Penelitian mengenai penggunaan pepton untuk mempercepat perkecambahan anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro* belum pernah dilakukan. Anggrek *G. stapeliiflorum* saat ini sudah mulai berkurang di habitat aslinya yang disebabkan oleh aktivitas manusia. Oleh karena itu diperlukan upaya konservasi melalui perbanyakan secara *in vitro*. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan

penelitian untuk mengetahui konsentrasi pepton yang optimum dalam mempercepat perkecambahan anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Desember 2021 sampai bulan Maret 2022.

2.2 Bahan Tanaman

Anggrek *G. stapeliiflorum* sebagai sumber eksplan dikoleksi dari kawasan hutan Lembah Harau, Kabupaten Lima Puluh Kota, Sumatera Barat.

2.3 Media Kultur

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Murashige and Skoog* (MS). Media MS dibuat sebanyak 1 liter dengan menambahkan gula dan agar sebanyak 30 gram dan 7 gram dan penambahan pepton sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada tekanan 17,5 psi dan temperature 121°C.

2.4 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan setelah terlebih dahulu dilakukan tahapan sterilisasi. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan mencelupkan buah ke dalam gelas Beaker yang berisi larutan detergen selama 15 menit, dan dibersihkan menggunakan aquadest steril. Buah direndam dengan larutan fungisida dan bakterisida masing-masing selama 20 menit selanjutnya dibersihkan menggunakan aquadest steril. Setelah itu buah dimasukkan kedalam larutan bayclin 20% selama 5 menit dan dibersihkan menggunakan aquadest steril. Dalam kondisi aseptis (dalam LAF), buah disemprot alkohol 70% lalu dibakar seluruh permukaannya sebanyak 2 sampai 3 kali. Buah diletakkan di atas cawan Petri dan dipotong menggunakan *scalpel*. Biji kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur dan diratakan di atas permukaan media

2.5 Rancangan Percobaan

Perlakuan berupa penambahan pepton pada media MS dengan konsentrasi 0, 0,5 g/L; 1g/L; 1,5 g/L; 2 g/L; 2,5 g/L. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Pengamatan terhadap parameter waktu munculnya protokorm diamati setiap hari sampai protokorm muncul disetiap botol perlakuan dan datanya dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA pada program SPSS versi 20, apabila terdapat pengaruh yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji DNMRT (*Duncan New Multiple Range Test*) pada taraf 5%. Pengamatan parameter persentase tahap-tahap perkecambahan dilakukan menggunakan mikroskop stereo setelah 10 minggu persemaian dan datanya dianalisis secara deskriptif

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Waktu Munculnya Protokorm

Protokorm merupakan bentuk peralihan dari embrio yang belum mengalami diferensiasi. Protokorm memiliki dua sumbu (bipolar) yang terdapat pada bagian anterior dan posterior. Protokorm merupakan embrio yang tidak memiliki testa. Selama proses perkembangannya

protokorm akan mengalami perubahan warna yakni dari kuning menjadi hijau. Perubahan warna pada protokorm disebabkan karena adanya pembentukan klorofil (Yusuf dan Indrianto, 2016).

3.2 Persentase Tahap-Tahap Perkembangan Embrio

Proses perkecambahan anggrek terdiri atas 7 tahapan. Tahap 0 ditandai dengan embrio belum berkembang. Tahap 1 ditandai dengan pembengkakan biji karena proses imbibisi, dan testa masih utuh. Tahap 2 adalah tahap membesarnya embrio sehingga sebagian embrio keluar dari testa. Tahap 2 merupakan tahap terjadinya germinasi (Perkecambahan). Tahap 3 merupakan tahap terbentuknya protokorm dan embrio lepas sepenuhnya dari testa. Tahap 4 merupakan tahap terbentuknya protokorm sudah membentuk promeristem (SAM dan RAM). SAM merupakan *shoot apical meristem* dan RAM merupakan *root apical meristem*. Tahap 5 merupakan tahap terbentuknya daun pertama. Tahap 6 merupakan tahap pemanjangan daun serta tahap 7 merupakan tahap terbentuknya daun kedua dan diikuti oleh pembentukan akar (Arcidiacono et al, 2021).

Penelitian ini dilakukan selama 10 minggu sehingga perkecambahan anggrek *G. stapeliiflorum* hanya mencapai tahap 4. Pemberian pepton dapat mempercepat waktu munculnya protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* dibandingkan dengan kontrol. Pemberian dari konsentrasi 1 g/L sampai 2,5 g/L pepton memberikan pengaruh yang sama dalam mempercepat waktu munculnya protokorm (Tabel 1). Pepton merupakan senyawa organik yang menjadi sumber nitrogen sehingga dapat mempercepat germinasi biji (Utami et al., 2017). Pemberian 2 g/L pepton dapat meningkatkan perkecambahan benih anggrek *Phalaenopsis* dibandingkan kontrol. Pepton mengandung ammonium nitrat, asam aspartat, glisin, amida nitrogen, dan asam amino yang berperan dalam menginduksi perkecambahan dan pertumbuhan biji anggrek (Shekarriz et al., 2014).

Pemberian pepton berpengaruh terhadap perkembangan embrio anggrek. Persentase perkembangan biji anggrek tahap 0 dan tahap 1 tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol. Tingginya persentase biji anggrek yang tidak berkecambah disebabkan karena tidak adanya pepton dalam media sehingga belum mampu mendorong persentase perkecambahan dalam jumlah yang maksimal (Tabel 1). Menurut Zeng, et al., (2016) kegagalan perkecambahan pada anggrek dapat disebabkan karena dormansi morfologis, dormansi fisiologis, dan dormansi fisik. Dormansi morfologis disebabkan karena embrio yang kurang berkembang. Dormansi fisiologis disebabkan karena adanya inhibitor pada biji yang sudah matang. Dormansi fisik disebabkan karena testa memiliki struktur yang tidak dapat ditembus air. Kandungan hormon asam absisat (ABA) pada biji dapat mengakibatkan dormansi (Ma et al., 2018). Nitrogen diduga dapat menghambat dormansi dengan menurunkan kandungan ABA pada biji. Barokah et al (2017) menyebutkan bahwa pepton merupakan sumber karbon, nitrogen, asam amino tirosin dan asam amino triptofan. Rendahnya persentase

Tabel 1. Waktu muncul protokorm dan persentase tahap-tahap perkecambahan anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* dengan pemberian beberapa konsentrasi pepton selama 10 minggu setelah penyemaian

Perlakuan pepton (g/L)	Waktu muncul protokorm (HSP)	Rata-rata persentase tahap-tahap perkecambahan biji (%)			
		0 d-an 1	2	3	4
A (Kontrol)	39,75 a	95,40	0,25	4,34	0,00
B (0,5)	28,75 b	87,20	5,90	6,88	0,00
C (1,0)	27,50 c	90,23	4,05	1,31	4,14
D (1,5)	27,25 c	72,82	3,66	9,66	13,84
E (2,0)	27,00 c	11,40	5,14	61,02	22,43
F (2,5)	28,00 bc	83,22	3,05	8,28	5,42

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada $\alpha = 5\%$, HSP = Hari setelah penyemaian.

perkecambahan pada perlakuan kontrol diduga disebabkan karena kandungan nitrogen pada media MS belum mampu menurunkan kandungan ABA pada biji.

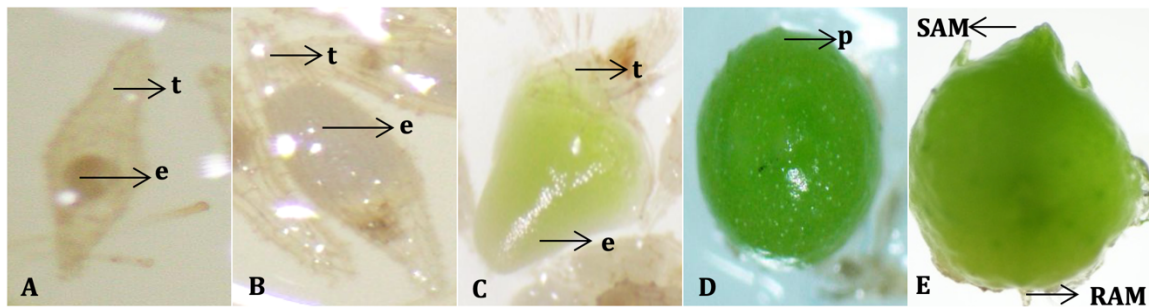
Persentase perkembangan biji anggrek tahap 2 (germinasi) terendah terdapat pada perlakuan kontrol. Rendahnya persentase perkembangan biji pada perlakuan kontrol menunjukkan bahwa laju perkecambahan pada perlakuan kontrol lebih rendah dibandingkan dengan penambahan pepton. Rendahnya persentase biji pada tahap 2 disebabkan karena dalam waktu 10 minggu setelah penyemaian, biji sudah berkembang mencapai tahap 3 dan tahap 4 (Tabel 1). Shekarriz *et al* (2014), menyebutkan bahwa pepton berperan dalam menginduksi germinasi dan pertumbuhan biji anggrek *Phalaenopsis* karena mengandung ammonium nitrat, asam aspartat, glisin, amida nitrogen, dan asam amino. Pepton merupakan sumber asam amino triptofan, Asam amino triptofan berperan sebagai prekursor auksin jenis IAA (*Indol Acetic Acid*) (Setiawan dan Wahyudi, 2014). IAA berperan dalam pembesaran, pembelahan dan diferensiasi sel serta jaringan. Kandungan IAA yang tinggi akan mendorong pembentukan embrio zigotik menjadi embrio globular (Ningsih dan Sudiyono, 2018). Perkecambahan tertinggi terjadi ketika embrio globular terbentuk (Xu *et al.*, 2020).

Persentase terbentuknya protokorm (tahap 3) tertinggi adalah pada perlakuan 2 g/L pepton (61,02%) dan terendah adalah pada perlakuan 1 g/L pepton (1,31%). Rendahnya persentase terbentuknya protokorm pada perlakuan 1 g/L pepton dibandingkan kontrol disebabkan karena sebagian protokorm pada perlakuan 1 g/L sudah mencapai tahap 4 yaitu (Tabel 1). Menurut Abbazadeh *et al* (2018), pepton merupakan sumber nitrogen organik dan penyusun asam amino yang memiliki peran dalam perkembangan embrio. Hasil yang sama ditunjukkan oleh Andayani *et al* (2013), persentase biji *Phalaenopsis amboinensis* yang berkecambah tertinggi yaitu pada penambahan 2 g/L pepton. Pembentukan protokorm pada penambahan 2,5 g/L pepton lebih rendah dibandingkan dengan penambahan 2 g/L pepton. Puspasari *et al* (2018) menyebutkan bahwa setiap sel memiliki batasan dalam menyerap unsur-unsur yang terkandung dalam media tanam. Pemberian pepton pada konsentrasi tinggi menyebabkan terjadinya persaingan dalam penyerapan unsur-unsur yang menghambat pertumbuhan protokorm.

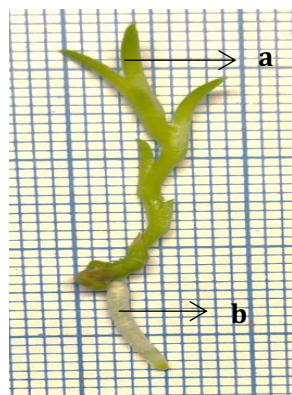
Pada perlakuan kontrol dan konsentrasi 0,5 g/L pepton tidak terdapat perkembangan protokorm anggrek membentuk SAM dan RAM (Tabel 1). Hal ini disebabkan karena kandungan nutrisi yang terdapat pada media belum mampu mendorong perkembangan protokorm. Persentase protokorm yang membentuk SAM dan RAM tertinggi yaitu pada perlakuan 2 g/L pepton (Tabel 1). Konsentrasi sitokinin pada tunas apikal berkorelasi positif dengan kandungan nitrogen dan asam amino yang terdapat pada pepton (Setiaji *et al.*, 2018). Sitokinin berperan dalam pertumbuhan tunas dan akar sehingga penambahan pepton dapat memicu perkembangan tunas dan akar. Sitokinin berperan dalam mengatur pembelahan sel, diferensiasi sel dan pembentukan kloroplas (Aremu *et al.*, 2012). Kaur dan Bhutani (2016) menyebutkan bahwa pepton mampu menginduksi tunas anggrek *Paphiopedilum venustum*. Alimah (2020) juga menyebutkan bahwa penambahan pepton sebesar 1,5 g/L dan 2 g/L pada media MS mampu menghasilkan protokorm yang memiliki SAM dan RAM yang lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Pada anggrek *Spathoglottis plicata* pembelahan mitosis secara aktif terjadi pada kutub apikal protokorm. Setelah itu sel-sel akan membentuk SAM. SAM akan terlihat dengan jelas karena sel mulai berbentuk persegi hingga bersudut (Yeung, 2017). Setiaji *et al* (2018) juga menyebutkan bahwa massa meristematik tersebut akan menghasilkan tonjolan dan menghasilkan daun pertama. SAM akan berkembang membentuk batang dan daun (Puspasari *et al.*, 2018). Protokorm yang berwarna hijau pada bagian yang bersentuhan dengan media kultur akan menghasilkan rhizoid (Setiaji *et al.*, 2018). Pada protokorm juga terdapat *absorbing hair* yang merupakan struktur yang menyerupai rambut yang berperan dalam penyerapan nutrisi (Puspasari *et al.*, 2018).

Biji anggrek yang belum berkecambah terdiri atas 2 tahap yaitu tahap 0 dan tahap 1. Tahap 0 ditandai dengan embrio masih belum berkembang dan warna embrio terlihat gelap. Diameter rata-rata



Gambar 1. Perkembangan perkecambahan biji anggrek *G. stapeliiflorum* dengan pemberian beberapa konsentrasi pepton setelah 10 minggu pada media persemaian. (A) Tahap 0. (B) Tahap 1. (C) Tahap 2. (D) Tahap 3. (E) Tahap 4. e = embrio, t = testa, p = protokorm, SAM = Shoot Apical Meristem, RAM = Root Apical Meristem.



Gambar 2. Anggrek *G. stapeliiflorum* setelah 7 bulan semai
Keterangan: a = daun, b= akar

embrio tahap 0 adalah 163,04 μm . Sifat permeabilitas dari testa akan memudahkan penyerapan air sehingga embrio membengkak. Diameter rata-rata embrio tahap 1 adalah 295,05 μm . Biji anggrek tahap 1 juga ditandai dengan adanya perubahan warna embrio menjadi bening. Pembengkakan embrio mengakibatkan robeknya testa (berkecambah). Pada tahap 2 sebagian embrio masih diselubungi oleh testa dan terjadi perubahan warna pada embrio menjadi hijau karena adanya pembentukan klorofil. Rata-rata diameter embrio tahap 2 adalah 871,31 μm . Tahap 3 merupakan tahap terbentuknya protokorm dan testa telah terlepas sepenuhnya. Rata-rata diameter protokorm adalah 2507,58 μm . Pada tahap 4 protokorm anggrek sudah berkembang membentuk SAM dan RAM yang akan berkembang menjadi plantlet. Rata-rata diameter protokorm pada tahap 4 adalah 2526,34 μm (Gambar 1).

4. KESIMPULAN

Penambahan pepton pada media MS dapat mempercepat waktu munculnya protokorm. Protokorm muncul pada hari ke-27 setelah penyemaian dengan penambahan 1 g/L sampai 2 g/L pepton. Pada perlakuan kontrol waktu munculnya protokorm lebih lambat yaitu pada hari ke-39 setelah penyemaian. Penambahan 2 g/L pepton merupakan konsentrasi yang optimum dalam meningkatkan persentase terbentuknya protokorm dan perkembangan protokorm membentuk SAM dan RAM dengan persentase secara berturut-turut sebesar 61,02% dan 22,43%.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis tujukan kepada Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas yang telah mensupport penelitian ini.

6. DASTAR PUSTAKA

- Abbaszadeh, S. M., S. M. Miri & R. Naderi. 2018. An Effective Nutrient Media for Asymbiotic Seed Germination and *In Vitro* Seedling Development of *Phalaenopsis* 'Bahia Blanca'. *Journal of Ornamental Plants*. 8(3): 183–192.
- Alimah, A. N. 'U. 2020. Pengaruh Konsentrasi Pepton terhadap Perkecambahan Biji dan Perkembangan Protocorm Anggrek *Grammatophyllum speciosum*. *Skripsi*. FMIPA Universitas Airlangga. Surabaya.
- Andayani, D., E. S. W. Utami & H. Purnobasuki. 2013. Pengaruh Pepton terhadap Perkecambahan Biji *Phalaenopsis amboinensis* secara *In Vitro*. *Jurnal Sains Teknologi*. 1(1): 1–10.
- Arcidiacono, M., C. Catalano, A. Motisi, M. Sajeva, F. Carimi & A. Carra. 2021. Influence of Culture Conditions on *In Vitro Asymbiotic Germination* of *Anacamptis longicornu* and *Ophrys panormitana* (Orchidaceae). *Plant* 10(11): 2543–2554
- Aremu, A. O., M. W. Bairu, K. Dolezal, J. F. Finnie & J. V. Staden. 2012. Topolins: A Panacea to Plant Tissue Culture Challenges? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 108(1): 1–16.
- Barokah, G. R., B. Ibrahim & T. Nurhayati. 2017. Characterization Microencapsul Pepton from Spoiled By Catch Fish Using Spray Drying Methods. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 401–412.
- CITES. 2017. *Grammatophyllum stapeliiflorum*. <https://checklist.cites.org>. Diakses pada 23 Maret 2022.
- Fandani, H. S., S. N. Mallomasang & I. N. Korja. 2018. Keanekaragaman Jenis Anggrek pada Beberapa Penangkaran di Desa Ampera dan Desa Karunia Kecamatan Palolo Kabupaten Sigi. *Jurnal Warta Rimba*. 6(3): 14–20.
- Huh, Y. S., J. K. Lee, S. Y. Nam, K. Y. Paek & G. U. Suh. 2016. Improvement of Asymbiotic Seed Germination and Seedling Development of *Cypripedium macranthos* Sw. with Organic Additives. *Journal Plant Biotechnol*. 43(1): 138–145.
- Isda, M. N & S. Fatonah. 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.
- Kartikaningrum, S., D. Pramanik, M. Dewanti, R. Seohandi & M.P. Yufdy. 2017. Konservasi Anggrek Spesies Alam Menggunakan Eksplan Biji pada Media Vacin & Went. *Plasma Nutfah*. 23(2): 109–118.
- Kaur, S. & K. K Bhutani. 2016. Asymbiotic Seed Germination and Multiplication of an Endangered Orchid–*Paphiopedilum venustum* (Wall. ex Sims.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 85(2): 3494–3504.
- Ma, Y., J. Cao, J. He, Q. Chen, X. Li & X. F. Y. Yang. 2018. Molecular Mechanism for the Regulation of ABA Homeostasis During Plant Development and Stress Responses. *Internationnal Journal of Molecul Sciences*. 19(11): 3643–3656.
- Mukaromah, L., T. Nurhidayati & S. Nurfadilah. 2013. Pengaruh Sumber dan Konsentrasi Nitrogen terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara *In Vitro*. *Jurnal Sains dan Seni Institut Teknologi Sepuluh November*. 2(1): 2337–2340.
- Ningsih, E. M & Sudiyono. 2018. Penambahan Triptofan pada Limbah Air Kelapa sebagai Sumber PGR Auksin, Seminar Nasional Hasil Riset CIASTEC, Universitas Widyagama Malang, Malang 12 September 2018. pp 401–408.

- Purwanto, A. W. 2016. *Anggrek Budidaya dan Perbanyakan*. LPPM UPN Veteran Yogyakarta Press. Daerah Istimewa Yogyakarta. Indonesia.
- Puspasari, R. R., I. N. Rosyidi., E. F. C. Ningrum & E. Semiarti. 2018. Pengaruh Pepton terhadap Pertumbuhan Embrio Anggrek *Vanda tricolor* lindley var. *Suavis* Asal Merapi secara *In Vitro*. *Jurnal Scripta Biologica* 5(1): 47–50.
- Setiaji, A., N. Setiari., & E. Semiarti. 2018. Induksi Tunas dari Protokorm Intak dan Fase Awal Perkembangan *Dendrobium phalaenopsis* secara *In Vitro*. Dalam: Setyawan, A. D., Sugiarto., A. Pitoyo., Sutomo., A. Widiastuti., G. Windarsih., Supatmi. Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia. Universitas Sebelas Maret. 18 September 2021. Masyarakat Bioriversitas Indonesia 4(1): 20–27.
- Setiawan & A. Wahyudi. 2014. Pengaruh Giberelin Terhadap Pertumbuhan Beberapa Varietas Lada untuk Penyediaan Benih Secara Cepat. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat* 25(2): 111–118.
- Shekarriz, P., M. Kafi., S. D. Deilany & M. Mirmasouri. 2014. Coconut Water and Peptone Improve Seed Germination and *Protocorm Like Body* Formation of Hybrid *Phalaenopsis*. *Agriculture Science Developments* 3(10): 317–322.
- Silalahi, M. 2015. Pengaruh Modifikasi Media Murashige-Skoog (MS) Dan Zat Pengatur Tumbuh BAP terhadap Pertumbuhan Kalus *Centella asiatica* L. (Urban.). *Jurnal ProLife* 2(1):14–23.
- Tharapan, S., C. Thepsithar & K. Obsuwan. 2014. An Effect of Organic Supplement of *Dendrobium* Protocorms and Seedlings. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*. 8 (7) : 699–704.
- Utami, E. S. W., S. Hariyanto & Y. S. W. Manuhara. 2017. *In Vitro* Propagation of the Endangered Medical Orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm Through Mature Seed Culture. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(5): 406–410.
- Vudala, S.M., & Ribas L.L.F. 2017. Seed Storage and Asymbiotic Germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*. 108: 1-7.
- Xu, X., L. Fangn., L. Li., G. Ma., K. Wu & S. Zeng. 2020. Absciscic Acid Inhibits Asymbiotic Germination of Immature Seeds of *Paphiopedilum armeniacu*. *International journal of Molecul Science*. 21(24): 9561-9573.
- Yeung, E. C. 2017. A Perspective on Orchid Seed and Protocorm Development. *Botanical Studies*. 58(1): 33-46.
- Yusuf, Y & A. Indrianto. 2016. Pengaruh Medium Pupuk Organik Cair (POC) Terhadap Karakter Morfologi dan Jumlah Tunas Protokorm Anggrek *Vanda limbata* Blume x *Vanda tricolor* Lindl. *Jurnal Bionature*. 17(1):14-23.
- Zeng, S., W. Huang., K. Wu., J. Zhang., J. A. T. da Silva. & J. Duan. 2016. *In vitro* propagation of paphiopedilum orchids. *Critical Reviews Biotechnology*. 36 (3): 521–534.