

THE EFFECT OF TDZ (*Thidiazuron*) ON THE FORMATION OF DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Phalaenopsis* sp. ORCHID

PENGARUH TDZ (*Thidiazuron*) TERHADAP PEMBENTUKAN DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS ANGGREK *Phalaenopsis* sp.

Intan Dwi Adinda¹, Didik Pudji Restanto^{2*}, Parawita Dewanti², Denna Eriani Munandar², Sri Hartatik², Mohammad Candra Prayoga¹, Umami Sholikhah³

¹ Master's Program in Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Jember, Jember, Indonesia

² Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Jember, Jember, Indonesia

³ Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Jember, Jember, Indonesia

*Corresponding Author. E-mail address: restanto.lemli@unej.ac.id

ARTICLE HISTORY:

Received: 3 October 2024

Peer Reviewed : 14 January 2025

Accepted: 10 April 2025

KEYWORDS:

Histology, *Phalaenopsis* sp.
SEM, somatic embryogenesis

KATA KUNCI:

Histologi, SEM, Somatik
Embriogenesis,
Phalaenopsis sp.

ABSTRACT

Orchids (*Phalaenopsis* sp.) are among the most valuable ornamental plants due to their wide range of flower colors and high commercial demand. However, conventional propagation methods are often inefficient for large-scale production, necessitating the optimization of tissue culture techniques for rapid and uniform clonal propagation. The use of appropriate plant growth regulators, particularly thidiazuron (TDZ), is crucial for enhancing somatic embryogenesis—a key pathway for orchid micropropagation. This study aimed to determine the optimal concentration of TDZ for inducing somatic embryogenesis in *Phalaenopsis* sp. through histological analysis and scanning electron microscopy (SEM) observations. A completely randomized design was employed using Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with four TDZ concentrations (1, 3, 5, and 7 mg/L). Leaf explants of *Phalaenopsis* sp. served as the explant source. The results demonstrated that direct somatic embryogenesis successfully occurred from leaf explants across treatments. Among the tested concentrations, 5 mg/L TDZ produced the most effective response, resulting in the highest somatic embryo formation rate (32%) and the shortest time to embryo maturation (37 days after culture initiation). The embryos exhibited characteristic dark green coloration and a crumbly texture. These findings highlight the pivotal role of TDZ in promoting somatic embryogenesis in *Phalaenopsis* sp., providing a reliable protocol for efficient orchid propagation. The study contributes to the advancement of orchid biotechnology by offering histological and ultrastructural evidence that supports the optimization of clonal propagation systems for commercial and conservation purposes.

ABSTRAK

Anggrek merupakan tanaman hias yang memiliki beragam warna bunga yang cantik. Optimasi perbanyakan klonal melalui teknik kultur jaringan dengan menambahkan zat pengatur tumbuh yang sesuai penting dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi TDZ yang optimal untuk pembentukan somatik embriogenesis pada tanaman anggrek *Phalaenopsis* sp. yang di kaji melalui pengamatan secara histologi dan *scanning electron microscope*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap non faktorial menggunakan hormon TDZ dengan beberapa konsentrasi (1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L dan 7 mg/L) yang ditambahkan pada media MS. Eksplan yang digunakan yaitu daun *Phalaenopsis* sp. Berdasarkan hasil penelitian eksplan daun berhasil beregenerasi melalui direct somatic embriogenesis. Perlakuan TDZ 5 mg/L menunjukkan hasil terbaik dalam menginduksi somatik embriogenesis *Phalaenopsis* sp. dengan parameter persentase embrio tertinggi 32%, kedinian embrio tercepat yaitu 37 HST dengan karakter embrio berwarna hijau tua dan teksture remah.

1. PENDAHULUAN

Phalaenopsis atau anggrek bulan merupakan anggrek yang memiliki nilai ekonomi tinggi dalam dunia florikultura (Hsieh et al., 2020). Di negara Taiwan, *Phalaenopsis* memberikan nilai ekonomi yang signifikan (Lu et al., 2024). Anggrek banyak diminati oleh masyarakat karena memiliki keunggulan keindahan berbagai macam warna dan corak. Anggrek menghasilkan jutaan biji dalam polongnya, namun permasalahan perbanyakan melalui biji menghasilkan bibit yang beragam (Jamja et al., 2023). Perbanyakan *Phalaenopsis* secara tradisional melalui stek menghasilkan tingkat perbanyakan yang rendah dan menghambat pertumbuhan tanaman induk. Upaya untuk memenuhi permintaan tanaman anggrek yang efektif dan efisien dapat melalui pendekatan bioteknologi yaitu melalui klonal secara in vitro (Anis & Ahmad, 2016). Menurut Zanello et al., (2022) perbanyakan klonal secara in vitro merupakan metode yang efektif dalam skala besar untuk perbanyakan *Phalaenopsis*, tetapi regenerasi klonal sulit dilakukan. Kontaminasi dan pencoklatan jaringan *inflorescence nodal segments* INS merupakan kesulitan utama yang diidentifikasi untuk perbanyakan klonal *Phalaenopsis* (Zanello et al., 2022).

Kultur jaringan *Phalaenopsis* dapat melalui somatik embriogenesis dan organogenesis. Somatik embriogenesis merupakan perkembangbiakan dalam pembentukan struktur bipolar baik secara langsung maupun tidak langsung atau melalui fase kalus (Hardjo & Savitri, 2017). Menurut Cardoso et al., (2020) perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik dapat menghasilkan bibit yang identik dan mempertahankan kualitas tanaman dari indukan. Metode perbanyakan anggrek melalui klonal menghasilkan tanaman yang identik dengan parentalnya (Zaira et al., 2023). Keberhasilan regenerasi *Phalaenopsis* melalui somatik embriogenesis dipengaruhi oleh eksplan, hormon dan komposisi nutrisi media kultur (Khatun et al., 2020).

Aplikasi sitokinin eksogen sangat penting untuk mencapai perbanyakan dan kualitas tanaman yang optimal (Murvanidze et al., 2024). Optimasi regenerasi *Phalaenopsis* dimulai dengan keseimbangan hormon yang diberikan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, konsentrasi 6-BA 4 mg/L menghasilkan laju perbanyakan tunas terbaik, sedangkan kombinasi 1,0 mg/L BA dan 1,5 mg/L GA3 menunjukkan persentase hidup yang lebih tinggi (71,48%) dan jumlah tunas yang lebih banyak (1,68 tunas) pada regenerasi *Phalaenopsis* (Zanello et al., 2022). Zat pengatur tumbuh menjadi faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan. TDZ memiliki tingkat keefektifan lebih tinggi dalam pembentukan somatik embriogenesis dibandingkan dengan sitokinin lainnya. Hormon TDZ meningkatkan efisiensi produksi dan konservasi anggrek yang langka (Yuniati & Isda, 2024). TDZ adalah salah satu sitokinin sintetis yang paling efektif untuk regenerasi bibit anggrek. Penggunaan TDZ dalam kombinasi dengan pengatur pertumbuhan lainnya dapat meningkatkan regenerasi (Mohanraj, 2018). TDZ berperan dalam mengatur induksi bunga, regenerasi eksplan dan pemecahan dormansi, serta proses penuaan daun pasca panen (Ren et al., 2023). Berdasarkan penelitian sebelumnya, TDZ 0,25 mg/L dan 0,5 mg/L pada media ½ VW menunjukkan hasil terbaik pada regenerasi anggrek *gramatophyllum* dengan parameter persentase pertumbuhan eksplan dan pembentukan embrio somatik (Yuniati & Isda, 2024). TDZ 1 mg/L efektif meningkatkan kecepatan muncul tunas pada anggrek *dendrobium* (Fuziani et al., 2023). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi TDZ yang optimal untuk pembentukan embriogenesis somatik pada tanaman anggrek *Phalaenopsis* sp. yang di kaji melalui pengamatan secara histologi dan *scanning electron microscope* SEM.

2. BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ekofisiologi dan Kultur Jaringan Tanaman, Program studi Agronomi, Fakultas Pertanian Universitas Jember. Alat-alat yang digunakan antara lain pinset,

scalpel, timbangan analitik, pH meter, autoclaf, LAF (*Laminar Air Flow*), mikroskop binokuler, dan mikroskop objektif. Bahan-bahan yang digunakan antara lain eksplan daun anggrek *Phalaenopsis* sp, media kultur MS (*Murashige and Skoog*), hormon TDZ (*Thidiazuron*), gula, gel agar-agar.

Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktor tunggal yaitu konsentrasi TDZ yang terdiri dari 4 taraf yaitu 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L dan 7 mg/L. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali sehingga didapatkan 40 unit percobaan. Media MS ditambahkan hormon TDZ sesuai konsentrasi perlakuan. Media disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada temperature 121°C selama 20 menit. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan dan perkembangan dari eksplan daun selama pembentukan somatik embriogenesis. Parameter pengamatan yang dilakukan antara lain kedinian kemunculan embrio somatik, persentase pembentukan embrio somatik, warna embrio somatik, tekstur embrio somatik, fase-fase perkembangan somatik embriogenesis, histologi dan *scanning electron microscope* (SEM).

Pengamatan somatik embriogenesis secara histologi dilakukan dengan mengamati preparat dari sampel. Tahapan pembuatan preparat histologi meliputi tahap fixation atau pengawetan sampel menggunakan formaldeyde. Fixation dilakukan selama 12-24 jam pada suhu 25-30° C. Kemudian sampel dilakukan dehidrasi menggunakan aseton dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, dan 90%). Sampel dilakukan clearing dengan menggunakan xylol. Pembeningan sampel dilakukan dengan merendam pada xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali. Sampel dilakukan pembedahan atau embedding dengan memasukkan sampel kedalam parafin cair. Blocking sampel menggunakan parafin. Sectioning sampel menggunakan microtom blade. Sampel diwarnai menggunakan heamatoxylin-eosin. Perekatan sampel pada kaca slides dan labeling. Pengamatan sampel menggunakan microscop binokuler pada pembesaran 100x.

Pengamatan embrio somatik melalui *scanning electron microscope* SEM dilakukan pada sampel yang di amati dengan Tabletop Microscope HITACHI TM3000. Pengamatan menggunakan SEM bertujuan untuk mengamati morfologi embrio yang lebih detail pada pembesaran 1mm dan 50 μ m. Data dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA). Hasil yang berbeda nyata antar perlakuan dilakukan analisis dengan uji DMRT pada taraf 5%. Analisis data menggunakan aplikasi statistika SPSS.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil uji ANOVA dengan taraf 0.05 (Gambar 1), perlakuan konsentrasi hormon TDZ memberikan pengaruh yang signifikan terhadap persentase embrio somatik dan kedinian muncul tunas pada eksplan daun *Phalaenopsis* sp. Menurut Ren et al., (2023) penambahan TDZ ke dalam media MS dapat merangsang regenerasi eksplan secara in vitro, menghasilkan tunas adventif, produksi kalus, proliferasi PLB dan mampu membentuk embrio globular. Penambahan TDZ akan berpengaruh terhadap pembentukan somatik embriogenesis secara langsung pada anggrek *Phalaenopsis*. Menurut Mohanraj (2018), TDZ merupakan sitokinin sintetis yang terbaik secara nyata mampu meningkatkan regenerasi dan perbanyakan planlet secara in vitro, TDZ dapat bekerja melalui modifikasi membran sel, kadar energi, penyerapan nutrisi, atau asimilasi nutrisi.

Penambahan TDZ pada konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap persentase pembentukan embrio dan kedinian kemunculan embrio somatik. Persentase pembentukan embrio terbesar dicapai oleh perlakuan TDZ 5 mg/L yaitu 32%. Kemunculan embrio tercepat terdapat pada perlakuan TDZ 5 mg/L yaitu rata-rata 37,88 HST, sedangkan respon persentase pembentukan embrio terendah dan kemunculan embrio yang paling lama terdapat pada perlakuan TDZ 1 mg/L yaitu 20% dan 41,64 HST. Semakin tinggi pemberian TDZ pada media MS dapat mempercepat perkembangan eksplan membentuk embrio, tetapi pada konsentrasi maksimal toleransi, eksplan menunjukkan respon yang tidak optimal. Hal ini sejalan dengan Mose et al., (2017)

pembentukan embrio somatik meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi TDZ ke media NP. Berdasarkan penelitian Yuniati & Isda (2024), penambahan TDZ pada konsentrasi rendah yaitu 0,25 mg/L dan 0,5 mg/L pada media VW menghasilkan persentase yang tinggi pada pertumbuhan eksplan membentuk embrio globular.

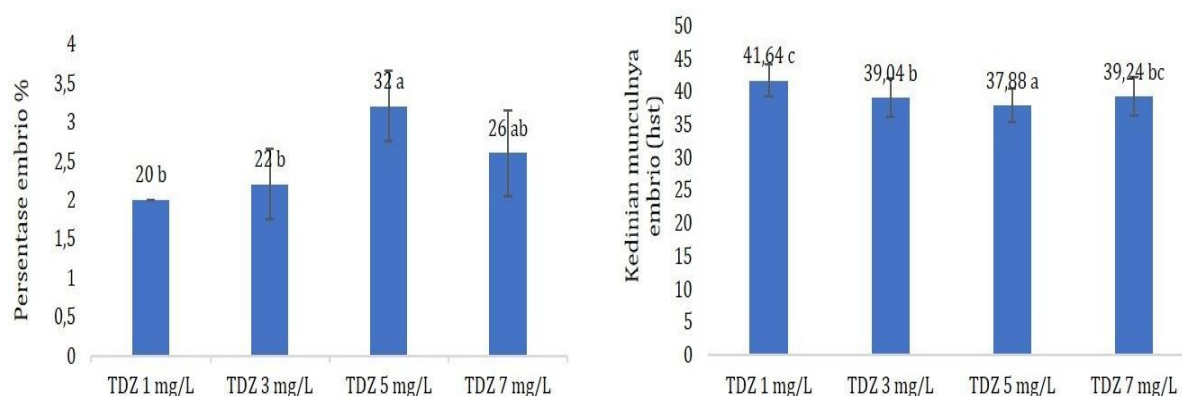
Optimasi konsentrasi hormon yang tepat sangat berpengaruh pada keberhasilan perbanyakan anggrek secara klonal. Konsentrasi hormon yang tidak tepat dapat menghambat penyerapan hormon endogen dan eksogen. Di dalam sel tanaman, terdapat hormon endogen auksin dan sitokinin namun dalam jumlah yang kecil, sehingga perlu penambahan hormon sitokinin secara eksogen dalam media untuk membantu proses pembelahan sel. Hormon sitokinin merupakan suatu golongan hormon tanaman esensial yang memainkan peran penting selama pertumbuhan tanaman secara *in vitro*. Sitokinin mengatur berbagai proses perkembangan antara lain pemeliharaan meristem, pembelahan sel, pembentukan tunas, dan penuaan daun (Murvanidze *et al.*, 2024).

Embrio somatik yang terbentuk pada eksplan menunjukkan tekstur yang remah dan kompak (Tabel 1). Perlakuan TDZ 5 mg/L dan 3 mg/L menunjukkan tekstur remah yang dicirikan dengan ukuran sel yang relatif kecil, jumlah sel yang semakin banyak dan terus membelah. Sedangkan pada perlakuan TDZ 1 mg/L dan 7 mg/L menunjukkan tekstur embrio yang kompak dicirikan ukuran sel lebih besar dan memadat. Embrio yang memiliki tekstur remah merupakan embrio dengan kualitas baik dikarenakan mudah memisah menjadi embrio tunggal.

Embrio yang terbentuk menghasilkan warna yang berbeda-beda, perbedaan tersebut menjadi indikator kualitas embrio yang tumbuh pada eksplan. Warna hijau yang dominan pada embrio menunjukkan bahwa sel hidup dan sel aktif membelah. Berbeda dengan embrio yang berwarna kuning menunjukkan bahwa sel mengalami browning. Pada penelitian ini penggunaan hormon TDZ tidak ditemukan embrio yang browning. Perubahan warna pada embrio yang semakin mengarah ke warna yang lebih tua menandakan bahwa embrio tersebut terus berkembang dan mengarah pada pembentukan tunas. Menurut Yuniati & Isda (2024), penambahan TDZ 0,75 mg/L pada media kultur meningkatkan kandungan klorofil tanaman.

Tabel 1. Tekstur dan warna embrio somatik pada eksplan daun *Phalaenopsis* sp

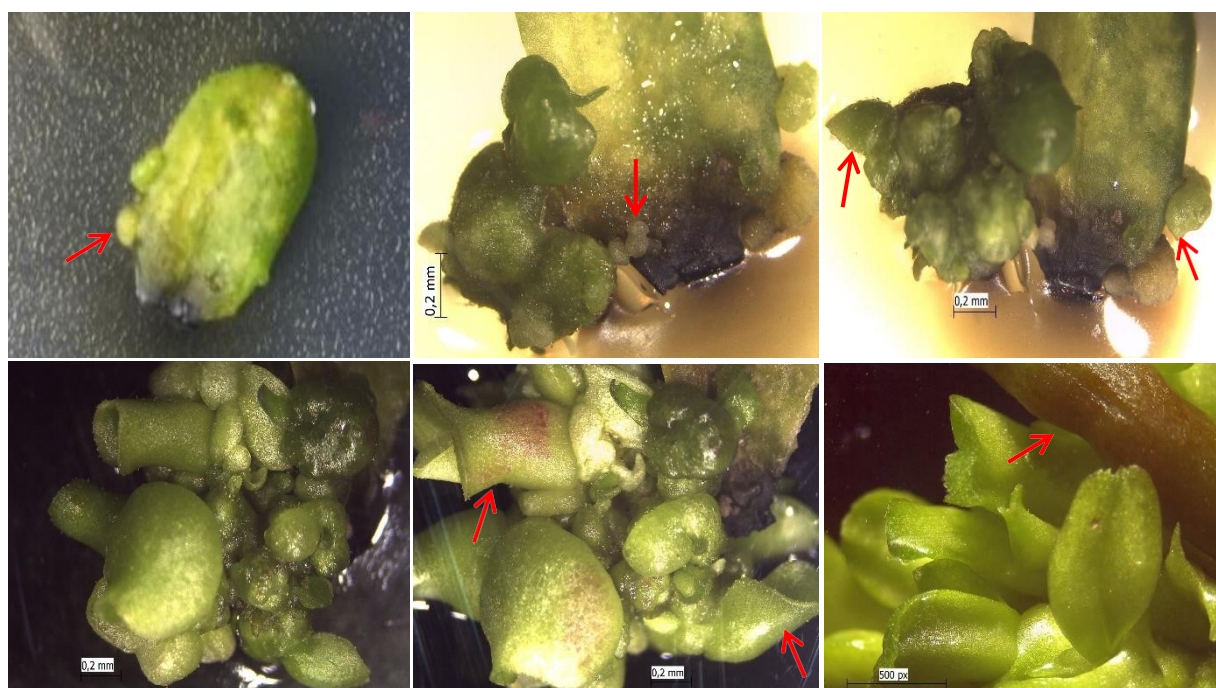
Perlakuan	Tekstur embrio somatik	Warna embrio somatic
TDZ 1 mg/L	Kompak	Hijau Tua (7,5 GY 6/10)
TDZ 3 mg/L	Remah	Hijau muda (7,5 GY 8/10)
TDZ 5 mg/L	Remah	Hijau Tua (7,5 GY 6/10)
TDZ 7 mg/L	Kompak	Hijau Muda (7,5 GY 8/10)



Gambar 1. Persentase embrio somatik dan kedinian munculnya embrio somatik pada anggrek *Phalaenopsis* sp.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa eksplan daun yang di inokulasi pada media MS dengan penambahan hormon TDZ beregenerasi melalui direct somatic embriogenesis. Eksplan daun dapat memunculkan pro-embrio pada permukaan eksplan (Gambar 2A). Embrio tersebut berwarna hijau muda dan bertekstur remah, selanjutnya embrio menunjukkan perubahan warna menjadi hijau tua dengan bentuk yang lebih besar menuju fase mature embrio (Gambar 2B). Embrio berkembang sampai memunculkan bakal tunas (Gambar 2C). Hal ini sesuai dengan penelitian Utami *et al.*, (2007) embrio globular dapat memanjang dengan struktur seperti tonjolan yang akan membentuk tunas. Berdasarkan pengamatan pada penelitian ini, tonjolan bakal tunas berkembang membentuk primordia daun (Gambar 2DE). Primordia daun berkembang membentuk daun (Gambar 2F). Perbanyakkan anggrek melalui klonal secara in vitro akan menghasilkan bibit skala besar dan identik dengan induknya. Hal ini dikarenakan perkembangan embrio somatik menyerupai perkembangan embrio zigotik dan mengalami tahap yang hampir sama (Mose *et al.*, 2017).

Berdasarkan pengamatan, regenerasi eksplan daun anggrek *Phalaenopsis* sp. efektif menggunakan hormon TDZ pada media MS. TDZ berfungsi dalam pembentukan organ tunas dan morfogenesis pada anggrek *Phalaenopsis* (Yuniati & Isda, 2024). TDZ dapat meningkatkan persentase eksplan hidup dan menurunkan resiko browning pada regenerasi anggrek *Grammatophyllum* secara in vitro (Utami *et al.*, 2007). TDZ mendorong munculnya tunas baru, tetapi tidak mempengaruhi morfologi tanaman, seperti tinggi batang, diameter batang, dan ukuran daun (Zhang *et al.*, 2019). Penggunaan TDZ efektif untuk regenerasi dan multiplikasi tunas (Mulgund *et al.*, 2011). Berdasarkan penelitian sebelumnya, penggunaan kombinasi hormon sitokinin TDZ 1 mg/L dan BAP 0,5 mg/L meregenerasi *Phalaenopsis* melalui indirect somatik embriogenesis atau melalui fase pembentukan kalus. (Rachmawati *et al.*, 2021). Pada penelitian ini penggunaan hormon sitokinin tunggal TDZ mampu menghasilkan tunas, namun tidak menunjukkan tanda pertumbuhan akar. Hal ini dapat disimpulkan bahwa, perlu dilakukan sub kultur pada media induksi akar dengan penambahan hormon auksin.

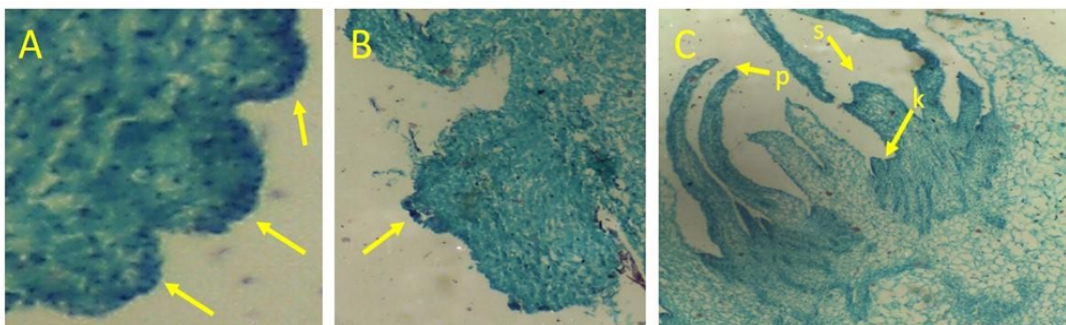


Gambar 2. Fase-fase perkembangan embrio somatik secara langsung pada anggrek *Phalaenopsis* sp. (A) Pembentukan pro-embrio pada eksplan daun, (B) Pro-embrio berkembang menuju fase mature embrio, (C) Awal kediniian munculnya bakal tunas pada embrio, (D,E) Perkembangan primordia daun, (F) Terbentuknya tunas dan daun.

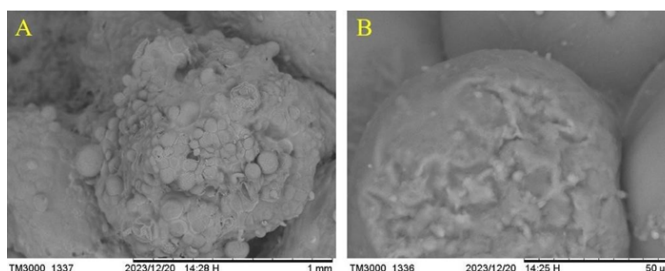
Pengamatan secara histologi dapat memberikan informasi yang lebih jelas dan detail pada bagian-bagian dari sel embrio. Pengamatan histologi memberikan informasi lebih lanjut tentang morfologi setiap fase regenerasi (Restanto *et al.*, 2023). Kemunculan pro-embrio pada eksplan daun teramati secara histologi menunjukkan struktur sel yang lebih kecil dan lebih padat (Gambar 3A). Hal ini menunjukkan bahwa pada fase pro-embrio, sel terus menerus mengalami pembelahan sel. Pro-embrio terus mengalami pembelahan menjadi fase mature embrio. Pada fase mature embrio sudah terdapat spot sel yang terus membelah berbentuk menonjol (Gambar 3B). Tonjolan pada spot embrio ini berkembang membentuk bakal tunas (Gambar 3C).

Pada fase pembentukan bakal tunas teramati bagian skutellar, kوليوptilar, dan primordia. Bagian skutellar terdiri dari sel-sel yang memiliki banyak sitoplasma dengan bentuk yang tidak teratur. Embrio yang berkembang akan mengalami diferensiasi pada bagian apikal embrio yang tersusun atas sel-sel dengan ukuran yang kecil dan aktif membelah. Pembelahan sel tersebut dikarenakan adanya kandungan sitokinin pada media, yang mana sitokinin diketahui memiliki peran dalam memacu pembelahan sel. Bagian koleoptilar membentuk jaringan primordia sebelum membentuk organ daun. Primordia merupakan jaringan yang membentuk bakal daun. Sampel yang diamati belum ditemukan adanya primordia akar. Hal ini menunjukkan bahwa pada tanaman anggrek *Phalaenopsis* bagian dari embrio somatik yang aktif membelah adalah kutub plumula. Akar anggrek adalah akar adventif yang muncul setelah adanya diferensiasi tunas, walaupun tidak ditemukan adanya primordia akar pada embrio, namun embrio somatik masih memiliki keterkaitan seluler melalui struktur seperti suspensor sehingga embrio dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh (Restanto *et al.*, 2018).

Berdasarkan hasil pengamatan histologi, eksplan daun beregenerasi membentuk fase-fase somatik embriogenesis antara lain fase pro-embrio, fase mature embrio, dan fase pembentukan tunas. Hal tersebut menunjukkan bahwa pengaplikasian hormon sitokinin TDZ berperan penting pada pembelahan sel dari eksplan beregenerasi membentuk embrio. Menurut Mose *et al.*, (2017) embrio somatik berasal dari sel epidermis dan sub-epidermal eksplan sebagai massa proembrionik yang terdiri dari sel-sel kecil berdinding tebal dengan inti besar dan berwarna padat. Pro-embrio membesar dan membentuk embrio. Strukturnya terdiri dari lapisan sel yang tersusun secara teratur dan rapat. Pada penelitian ini, pengamatan melalui *scanning electron microscope* SEM mengkonfirmasi morfologi embrio somatik yang lebih detail.



Gambar 3. Histologi fase-fase pembentukan embrio somatik pada *Phalaenopsis* sp. (A) fase pro-embrio, (B) fase mature embrio, (C) fase awal pembentukan tunas, p:primordia, s:skutellar, k:kوليوptilar.



Gambar 4. Pengamatan embrio somatik melalui *scanning electron microscope* SEM. (A) fase embrio globular pada pembesaran 1 mm, (B) fase embrio globular pada pembesaran 50 μm .

Berdasarkan pengamatan melalui SEM dengan pembesaran 1 mm, permukaan embrio yang remah terdapat banyak bakal pro-embrio yang berbentuk bulat dengan ukuran kecil (Gambar 4A). pengamatan dengan pembesaran 50 μm menunjukkan pro-embrio yang rapat dengan bentuk bulat (Gambar 4B). Pro-embrio inilah yang berpotensi berkembang menjadi embrio-embrio dalam skala besar. Banyaknya pro-embrio yang muncul dan berkembang menjadi embrio baru menunjukkan bahwa pengaruh TDZ efektif dalam perbanyakan klonal *Phalaenopsis* sp. Hal ini sejalan dengan pendapat Mose et al. (2017), hormon TDZ 3 mg/L mampu menghasilkan pembentukan embrio somatik *Phalaenopsis* mencapai 100%.

4. KESIMPULAN

Eksplan daun beregenerasi membentuk fase-fase somatic embryogenesis antara lain fase pro-embrio, fase mature embrio, dan fase pembentukan tunas. Perlakuan TDZ 5 mg/L menunjukkan hasil terbaik dengan parameter persentase pembentukan embrio terbesar yaitu 32% dan pembentukan embrio tercepat yaitu 37 HST. Karakter embrio berwarna hijau tua dan tekstur remah. Melalui analisis SEM terlihat perkembangan pro-embrio baru menjadi embrio dalam jumlah banyak.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada LP2M Universitas Jember yang telah mensponsori penelitian ini melalui dana internal percepatan guru besar dan DD Orchid Nursery Batu Jawa Timur yang telah berkolaborasi dalam penyediaan bahan tanam anggrek *Phalaenopsis*.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Anis, M., & N. Ahmad. 2016. plant tissue culture : propagation , conservation and crop improvement. *Springer*.
- Cardoso, J. C., C. A. Zanello, & J. T. Chen. 2020. An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(3).
- Fuziani, Z., E. P. Utami, & A. Rahmadi. 2023. Pengaruh zat pengatur tumbuh thidiazuron (TDZ) terhadap pembentukan tunas protocorm like body (PLB) anggrek dendrobium dian agrihorti pada berbagai jenis media tanam secara in vitro. *Prosiding Seminar Nasional Pertanian*. 33, 316– 327.
- Hardjo, P. H., & W. D. Savitri. 2017. Somatic embryo from basal leaf segments of vanda tricolor lindl. var. pallida. *KnE Life Sciences*. 3(5):173.
- Hsieh, K. T., S. H. Liu, I. W. Wang, & L. J. Chen. 2020. Phalaenopsis orchid miniaturization by overexpression of OsGA2ox6, a rice GA2-oxidase gene. *Botanical Studies*. 61(1).

- Jamja, T., S. Bora, R. Tabing, N. Tagi, A. K. Chaurasiya, S. N. Devi, & M. Yangfo. 2023. Symbiotic germination in orchids: an overview of ex situ and in situ symbiotic seed germination. *Ecology, Environment and Conservation*. 29(03):1251–1265.
- Khatun, K., U. K. Nath, & M. S. Rahman. 2020. Tissue culture of phalaenopsis: Present status and future prospects. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 3(3):273–285.
- Lu, Y. C., Y. H. Chen, T. H. Huang, R. Y. Liu, & R. S. Shen. 2024. Effects of paclobutrazol on reproductive and vegetative traits of phalaenopsis join grace 'TH288-4'. *Plants*. 13(17).
- Mohanraj, R. 2018. Role of thidiazuron in tissue culture of orchids. *Springer*. 455–462.
- Mose, W., A. Indrianto, A., Purwantoro, & E. Semiarti. 2017. The Influence of thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* (L.) blume orchid. *HAYATI Journal of Biosciences*. 24(4):201–205.
- Mulgund, G. S., K. Nataraja, R. B. Malabadi, & S. V. Kumar. 2011. TDZ induced in vitro propagation of an epiphytic orchid *Xenikophyton smeeanum* (Reichb. f.). 1(4):7–15.
- Murvanidze, N., K. Dolezal, L. Plackova, & S. P. O. Werbrouck. 2024. Metabolism of fluorinated topolin cytokinins in micropropagated *Phalaenopsis amabilis*. *Horticulturae*. 10(7):727.
- Rachmawati, F., D. S. Badriah, & B. Marwoto. 2021. Pengaruh jenis eksplan dan asam amino pada inisiasi dan proliferasi kalus embriogenik phalaenopsis var. 'Raiza Agrihorti.' *Jurnal Hortikultura*. 31(1):11.
- Ren, S., M. Hu, Q. Wu, L. Wang, H. Gu, Z. Chen, Z. Ming, & Z. Li. 2023. Flowering Time and Physiological Reaction of *Dendrobium nobile* Lindl in Response to TDZ Application.
- Restanto, D. P., B. Kriswanto, M. N. Khozin, & S. Soeparjono. 2018. Kajian thidiazuron (TDZ) dalam induksi plb anggrek *Phalaenopsis* sp. secara in vitro. *Agritop*. 16(1):176–185.
- Restanto, D. P., I. Felayati, W. I. D. Fanata, P. Dewanti, B. Kriswanto, M. N. Khozin, & M. C. Prayoga. 2023. Optimization of TDZ hormone on the formation of somatic embryogenesis in dendrobium orchids (D . 50TH Stage Beauty X D . Bobby Mesina). *Jurnal Nature Indonesia*. 21(February): 42–46.
- Utami, E. S. W., I. Soemardi, T. Taryono, & E. Semiarti. 2007. Embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl: struktur dan pola perkembangan. *Berkala Penelitian Hayati*. 13(1): 33–38.
- Yuniati, & M. N. Isda. 2024. Combination of thidiazuron and basal media type on optimizing in vitro growth of *Grammatophyllum stapeliiflorum* orchids. *Jurnal Ilmiah Pertanian*. 21(1): 21–32.
- Zaira, K., C. Maximiano, J. Grasiela, S. Santana, L. Eliza, & O. Alves. 2023. The Auxin and Cytokinin Balance Influence the in Vitro Regeneration of *Phalaenopsis* Shoots (*Orchidaceae*).
- Zanello, C. A., W. N. Duarte, D. M. Gomes, & J. C. Cardoso. 2022. Micropropagation from inflorescence nodal segments of phalaenopsis and acclimatization of plantlets using different substrates. *Horticulturae*. 8(4).
- Zhang, D., Y. Liao, S. Lu, C. Li, & Z. Shen. 2019. Effect of thidiazuron on morphological and flowering characteristics of *Dendrobium* 'Sunya Sunshine' potted plants. 0671.