Jurnal Biologi Tropis

Original Research Paper

The Effect of NAA and BAP on Callus Induction in Orchids (Orchidaceae): Literature Review

Dora Dona Ladesta Manalu & Ratih Restiani*
Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia;

Article History
Received : August 11th, 2026
Revised : October 08th, 2026
Accepted : October 26th, 2026

*Corresponding Author: **Ratih Restiani**, Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia; Email: ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id

Abstract: Orchids are ornamental plants of high economic value; however, their conventional propagation is often challenging, time-consuming, and inefficient due to their extremely small seeds and the absence of endosperm as a food reserve. Therefore, in vitro tissue culture has become an important approach for large-scale propagation and orchid conservation. This literature review discusses the basic principles of tissue culture, its applications in orchids, and the factors affecting its success. The reviewed studies indicate that the combination of BAP and NAA can influence callus induction in various orchid species. Effective concentrations generally range from 0.5–2.5 mg/L NAA and 0.5–2.0 mg/L BAP, either in combination or alongside other auxin and cytokinin plant growth regulators (PGRs). Relatively higher NAA concentrations than BAP may favor the early stages of callus formation by promoting cell dedifferentiation and division, while BAP may subsequently support cell proliferation. Nevertheless, callus induction is also influenced by the explant's endogenous hormonal balance and physiological condition. An imbalance between endogenous hormones and exogenously applied PGRs may interfere with regeneration, induce physiological stress, or cause tissue necrosis. These findings highlight the importance of optimizing PGR concentrations according to the orchid species and explant used to improve callus induction success.

Keywords: BAP; Callus; NAA; Orchidaceae; Tissue Culture.

Pendahuluan

Kultur jaringan (*In Vitro Culture*) adalah suatu teknik perbanyakan tanaman yang dilakukan di luar tubuh tanaman induk dalam kondisi aseptik, dengan memanfaatkan bagian kecil dari tanaman (eksplan), untuk ditumbuhkan pada media nutrisi steril (Hartati *et al.,* 2017). Menurut Dwiyani *et al.* (2022). kultur jaringan mampu menghasilkan perbanyakan dalam jumlah besar, kualitas yang seragam, bibit bebas penyakit, dan membantu pelestarian plasma nutfah, terutama bagi jenis tanaman yang sulit diperbanyak secara konvensional, seperti anggrek. Anggrek (Orchidaceae) adalah salah satu famili tanaman hias terbesar dengan nilai ekonomi tinggi di pasar global, karena keindahan dan keunikan pada bunganya yang beragam (Humaira *et al.,* 2020).

Perbanyakan anggrek secara konvensional biasanya dilakukan secara vegetatif melalui stek batang maupun secara generatif menggunakan biji. Namun, kedua metode ini seringkali kurang efisen dikarenakan membutuhkan waktu yang cukup lama dan tingkat keberhasilannya rendah. Kondisi ini disebabkan karena biji anggrek yang sangat kecil, tidak memiliki cadangan makanan (endosperma), serta memerlukan simbiosis dengan jamur tertentu agar dapat berkecambah, sehingga proses perbanyakannya menjadi lambat (Kumar *et al.,* 2022). Oleh karena itu, penerapan kultur jaringan menjadi penting dalam perbanyakan anggrek, baik melalui perkecambahan biji tanpa keterlibatan jamur

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

© 2026 The Author(s). This article is open access

secara asimbiotik maupun melalui mikropropagasi vegetatif. Metode ini berpotensi menghasilkan bibit dalam jumlah besar dalam kondisi terkendali, sekaligus menunjang pemenuhan kebutuhan komersial dan pelestarian anggrek (Fatahi *et al.,* 2022).

Keberhasilan kultur jaringan dalam mendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan dipengaruhi oleh jenis serta komposisi media kultur yang digunakan. Media Murashige dan Skoog (MS) merupakan salah satu media dasar yang banyak digunakan dalam perbanyakan tanaman anggrek secara in vitro. Selain MS, media Knudson C (KC) dan Vacin & Went (VW) juga sering digunakan dengan mempertimbangkan jenis anggrek dan kebutuhan pertumbuhannya. Untuk mengoptimalkan respons pertumbuhan eksplan, media kultur umumnya dilengkapi dengan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang berperan dalam mengendalikan proses fisiologis tanaman.

ZPT merupakan senyawa organik yang bekerja pada konsentrasi rendah dan berfungsi sebagai sinyal kimia dalam mengatur pertumbuhan serta perkembangan sel dan jaringan tanaman, termasuk pembentukan akar, tunas, dan kalus (Hartati *et al.,* 2022). Auksin dan sitokinin merupakan dua golongan ZPT yang umum digunakan dalam kultur jaringan. Kombinasi kedua ZPT tersebut dapat memengaruhi respons morfogenesis eksplan, termasuk pembentukan kalus dan tunas, bergantung pada jenis serta konsentrasi yang diberikan (Li Chin Chai *et al.,* 2024).

Salah satu auksin sintetik yang banyak digunakan adalah NAA (Naphthalene Acetic Acid), yang berperan dalam mengatur pembelahan dan diferensiasi sel serta dapat mendukung pembentukan akar dan kalus. Sementara itu, BAP (Benzyl Amino Purine) merupakan golongan sitokinin yang berperan dalam merangsang pembelahan sel dan pembentukan tunas. Interaksi antara BAP dan NAA menjadi salah satu aspek penting yang perlu diperhatikan dalam menentukan kombinasi ZPT yang sesuai untuk mengoptimalkan induksi tunas secara in vitro.

Induksi kalus merupakan salah satu pendekatan dalam kultur jaringan anggrek yang berpotensi mendukung regenerasi tanaman melalui organogenesis tidak langsung dan embriogenesis somatik. Kalus terbentuk melalui proliferasi sel yang belum terdiferensiasi secara sempurna, dengan keberhasilan pembentukannya dipengaruhi oleh kondisi kultur dan komposisi zat pengatur tumbuh (ZPT). Kombinasi NAA sebagai auksin dan BAP sebagai sitokinin menjadi salah satu aspek yang perlu dikaji karena interaksi kedua ZPT tersebut dapat memengaruhi respons pembentukan kalus. Meskipun beberapa penelitian melaporkan respons induksi kalus yang lebih baik melalui kombinasi NAA dan BAP dibandingkan pemberian ZPT secara tunggal, efektivitas perlakuan tetap bergantung pada konsentrasi, rasio kombinasi, jenis eksplan, dan spesies anggrek (Annisa *et al.,* 2023; Kaladharan *et al.,* 2024)(Kaladharan et al., 2024). Oleh karena itu, mini review ini bertujuan untuk mengevaluasi temuan penelitian terdahulu mengenai pengaruh NAA dan BAP terhadap induksi kalus pada anggrek serta mengidentifikasi pola respons dan faktor-faktor yang memengaruhi keberhasilannya.

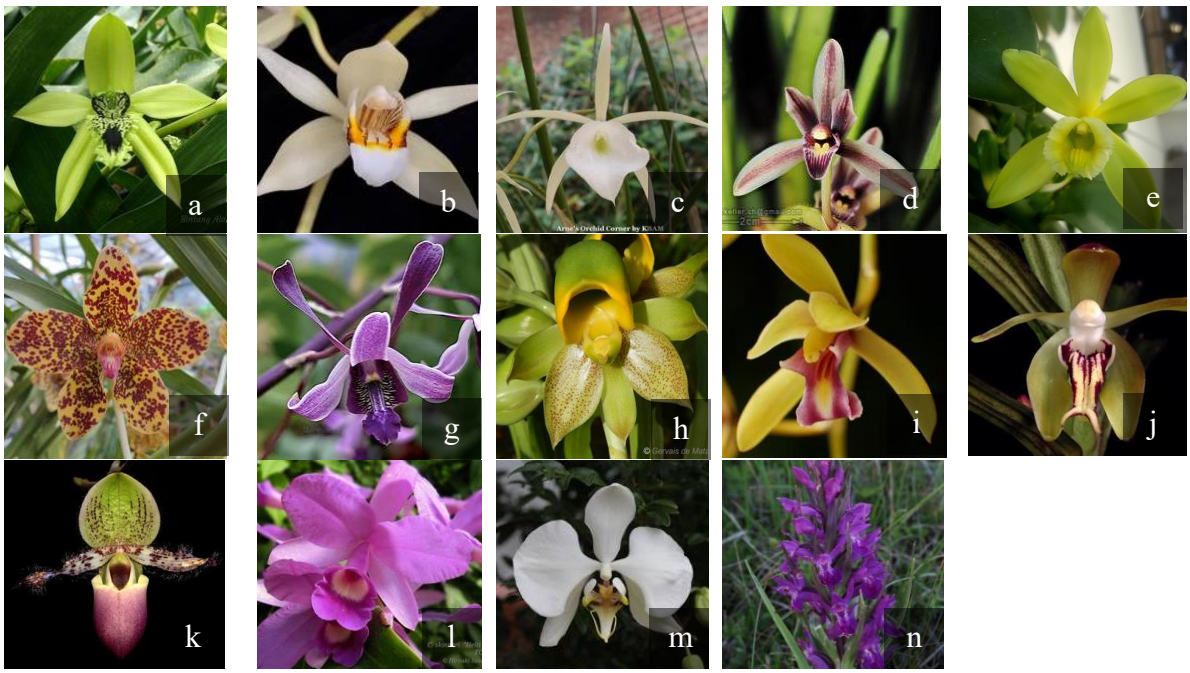
Bahan dan Metode

Metode yang digunakan melalui pendekatan studi literatur (*literature review*) untuk memperoleh pemahaman mengenai pengaruh NAA dan BAP terhadap proses induksi kalus pada anggrek (Orchidaceae). Literatur dikumpulkan dari artikel ilmiah yang diterbitkan pada tahun 2015–2025 dengan kriteria berasal dari jurnal terakreditasi SINTA 1–2 atau terindeks Scopus Q1–Q4. Informasi mengenai status jurnal diperiksa melalui SINTA dan SCImago Journal Rank (SJR). Pencarian artikel dilakukan pada Google Scholar, Connected Papers, PubMed, ResearchGate, dan Research Rabbit dengan menggunakan kata kunci yang berkaitan dengan topik kajian, yaitu BAP, NAA, induksi kalus, kultur jaringan, dan Orchidaceae. Dari proses penelusuran tersebut, diperoleh 42 artikel ilmiah yang selanjutnya diseleksi berdasarkan relevansi dan dianalisis untuk membandingkan hasil penelitian terdahulu. Analisis ini bertujuan untuk merangkum bukti ilmiah dan menarik kesimpulan mengenai peran NAA dan BAP dalam induksi kalus pada anggrek.

Hasil dan Pembahasan

Anggrek (Orchidaceae)

Orchidaceae merupakan famili tumbuhan berbunga yang memiliki keanekaragaman taksonomi dan morfologi yang tinggi. Famili ini diperkirakan mencakup sekitar 700 genus dan 30.000 spesies dengan persebaran geografis yang luas, terutama di kawasan tropis dan subtropis (Wang *et al.,* 2024). Keragaman tersebut terlihat dari perbedaan karakteristik bunga antargenus dan antarspesies, yang meliputi bentuk, warna, ukuran, serta pola bunga. Keunikan morfologi tersebut berkontribusi terhadap nilai estetika dan nilai ekonomi anggrek, khususnya dalam industri tanaman hias. Sejumlah genus, seperti Phalaenopsis, Oncidium, Vanda, Dendrobium, dan Cymbidium, dikenal luas dalam perdagangan anggrek global Tiwari *et al.* (2024). Meskipun sebagian besar dikenal sebagai tanaman hias, anggrek juga memiliki potensi pemanfaatan lain. Salah satu contohnya adalah Vanilla planifolia, yang buahnya digunakan sebagai bahan baku vanila. Gambaran mengenai keanekaragaman morfologi bunga pada famili Orchidaceae (Gambar 1).



Gambar 1. Keragaman bentuk bunga dari beberapa spesies anggrek yang berasal dari genus berbeda (a). *Coelogyne pandurata*, Lindl. (b). *Coelogyne flaccida*, Lindl, (c). *Brassavola tuberculata*, Hook. (d). *Cymbidium aloifolium*, (L.) Sw. (e). *Vanilla planifolia*, Andrews, (f). *Grammatophyllum speciosum*, Blume, (g). *Dendrobium lineale*, Rolfe, (h). *Catasetum macrocarpum*, Rich. ex Kunth, (i). *Cymbidium finlaysonianum*, Lindl. (j). *Vanda cristata*, Wall. ex Lindl. (k). *Paphiopedilum glaucophyllum*, J.J.Sm. (l). *Guarianthe skinneri*, (Bateman) Dressler & W.E.Higgins, (m). *Phalaenopsis amabilis*, (L.) Blume, (n). *Dactylorhiza hatagirea* (D.Don) Soó, (sumber: OrchidRoots)

Anggrek termasuk kelompok tumbuhan monokotil yang sebagian jenisnya memiliki pseudobulb (batang semu) sebagai tempat penyimpanan air dan cadangan nutrisi. Berdasarkan tempat tumbuhnya, anggrek dapat dikelompokkan menjadi epifit yang menempel pada tumbuhan lain, terestrial yang tumbuh di tanah, dan litofit yang tumbuh di bebatuan. Beberapa jenis anggrek juga memiliki pola hidup yang berkaitan erat dengan bahan organik dan jamur (Wang *et al.,* 2024). Morfologi anggrek memiliki karakteristik khas pada organ vegetatif maupun generatif. Akarnya umumnya berbentuk silindris, berdaging, dan berwarna putih. Berdasarkan pola pertumbuhannya, anggrek dibedakan menjadi dua tipe, yaitu monopodial dan simpodial.

Tipe monopodial memiliki batang utama yang tumbuh terus-menerus ke arah atas tanpa membentuk pseudobulb, sedangkan tipe simpodial memiliki pertumbuhan batang utama yang terbatas dan menghasilkan tunas baru atau

pseudobulb. Daun anggrek umumnya berbentuk memanjang, relatif tebal, serta memiliki tulang daun sejajar. Sementara itu, bunga anggrek memiliki struktur khas yang meliputi tiga sepal, dua petal, dan satu labelum atau bibir bunga yang merupakan modifikasi petal. Organ reproduksinya terdiri atas benang sari dan putik yang umumnya menyatu membentuk kolom, serta bakal buah yang berkembang menjadi buah setelah pembuahan. Labelum berperan penting dalam membantu menarik dan mengarahkan penyerbuk (Zhang *et al.,* 2018).

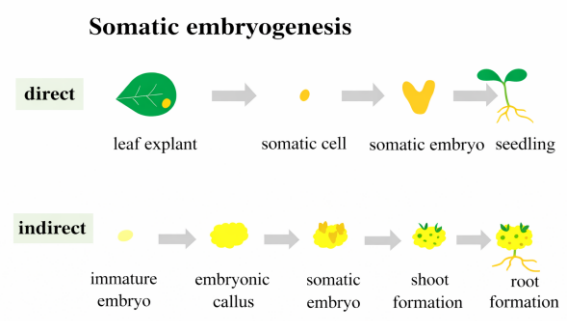
Anggrek menghasilkan buah berbentuk kapsul yang mengandung biji berukuran sangat kecil dan tidak memiliki endosperma sebagai cadangan makanan. Karakteristik tersebut menjadi salah satu faktor yang menyebabkan perbanyakan anggrek secara alami relatif sulit, karena biji umumnya memerlukan simbiosis dengan fungi mikoriza untuk memperoleh nutrisi yang mendukung perkecambahannya (Zhao *et al.,* 2021). Selain itu, perbanyakan anggrek secara vegetatif melalui metode konvensional juga membutuhkan waktu relatif lama, sehingga produksi bibit belum dapat berlangsung secara optimal.

Keterbatasan tersebut turut memengaruhi ketersediaan bibit dan mendukung tingginya nilai ekonomi anggrek sebagai komoditas hortikultura. Oleh karena itu, diperlukan metode perbanyakan alternatif yang lebih efisien, salah satunya melalui teknik kultur jaringan. Teknik ini berpotensi menghasilkan bibit dalam jumlah besar dalam waktu relatif singkat, sehingga dapat membantu memenuhi kebutuhan pasar sekaligus mendukung upaya konservasi anggrek.

Prinsip Kultur Jaringan pada Anggrek

Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan tanaman dengan memanfaatkan sel, jaringan, atau organ tanaman yang ditumbuhkan pada media nutrisi buatan dalam kondisi aseptik dan lingkungan yang terkontrol (Long *et al.,* 2022). Teknik ini banyak diterapkan pada tanaman yang sulit diperbanyak secara generatif, salah satunya anggrek. Biji anggrek berukuran sangat kecil dan tidak memiliki endosperma sebagai cadangan makanan, sehingga perkecambahannya di alam umumnya bergantung pada asosiasi dengan jamur mikoriza. Oleh karena itu, kultur jaringan menjadi alternatif yang efektif untuk menghasilkan bibit anggrek dalam jumlah besar, relatif seragam, dan dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan metode perbanyakan konvensional. Selain itu, penerapan kondisi aseptik dapat meminimalkan risiko kontaminasi mikroorganisme sehingga mendukung produksi bibit yang sehat.

Teknik ini juga berperan dalam upaya konservasi, terutama untuk mendukung pelestarian spesies anggrek langka dan endemik (Espinosa-Leal *et al.,* 2018). Keberhasilan kultur jaringan didasarkan pada prinsip totipotensi, yaitu kemampuan sel tanaman untuk berkembang menjadi individu tanaman utuh apabila didukung oleh kondisi dan lingkungan tumbuh yang sesuai (Su *et al.,* 2021). Salah satu jalur regenerasi tanaman melalui kultur jaringan adalah embriogenesis somatik, yaitu proses pembentukan embrio dari sel-sel somatik yang tidak terlibat langsung dalam reproduksi seksual. Sel-sel tersebut mengalami perubahan perkembangan hingga membentuk embrio somatik yang selanjutnya dapat berkembang menjadi tanaman utuh atau planlet.



Gambar 2. Jalur regenerasi tanaman secara embriogenesis somatik (Long *et al.,* 2022)

Berdasarkan proses pembentukannya, embriogenesis somatik dibedakan menjadi dua jalur, yaitu langsung (*direct*) dan tidak langsung (*indirect*) (Gambar 2). Pada jalur langsung, embrio somatik terbentuk dari jaringan eksplan tanpa melalui tahap pembentukan kalus. Sebaliknya, jalur tidak langsung melibatkan pembentukan kalus terlebih dahulu, kemudian sel-sel pada kalus embriogenik berkembang menjadi embrio somatik. Jalur tidak langsung berpotensi menghasilkan banyak tanaman baru dari satu sumber eksplan, tetapi umumnya membutuhkan tahapan tambahan dan dapat meningkatkan risiko terjadinya variasi

somaklonal, yaitu perubahan sifat genetik atau fenotipik pada tanaman hasil kultur (Long *et al.,* 2022).

Tipe-tipe kultur jaringan pada anggrek

Kultur jaringan anggrek dapat dilakukan melalui beberapa teknik, antara lain perkecambahan biji secara asimbiotik (asymbiotic seed germination), pembentukan protocorm-like bodies (PLBs), organogenesis de novo, serta kultur kalus. Perkecambahan biji secara asimbiotik merupakan teknik perbanyakan yang dilakukan dengan menumbuhkan biji anggrek secara aseptik pada medium nutrisi buatan tanpa keterlibatan langsung jamur mikoriza. Teknik ini memungkinkan biji anggrek yang berukuran sangat kecil dan secara alami bergantung pada asosiasi mikoriza untuk berkecambah dan berkembang menjadi protocorm hingga plantlet.

Penerapannya banyak dimanfaatkan untuk mendukung konservasi dan perbanyakan anggrek dalam jumlah besar (Koene *et al.,* 2019). Selain melalui perkecambahan biji, perbanyakan anggrek dapat dilakukan dengan menginduksi PLBs, yaitu struktur menyerupai protocorm yang memiliki kemampuan untuk berkembang menjadi plantlet utuh. PLBs banyak dimanfaatkan dalam mikropropagasi karena mendukung regenerasi dan perbanyakan tanaman secara efisien. Mikropropagasi juga dapat dilakukan melalui kultur meristem, yaitu penggunaan jaringan pada titik tumbuh tanaman yang memiliki aktivitas pembelahan sel tinggi. Jaringan ini berpotensi menghasilkan tanaman bebas virus karena infeksi virus pada meristem umumnya lebih terbatas dibandingkan jaringan tanaman lainnya, meskipun keberhasilannya tetap bergantung pada jenis virus dan metode kultur yang digunakan (Benke *et al.,* 2023).

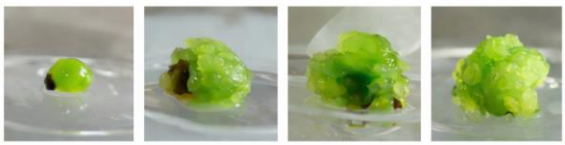
Teknik lainnya adalah organogenesis de novo, yaitu proses pembentukan organ baru, seperti tunas atau akar, dari jaringan tanaman yang dikulturkan. Berdasarkan jalur regenerasinya, organogenesis dibedakan menjadi organogenesis langsung dan tidak langsung. Organogenesis langsung terjadi ketika organ terbentuk dari eksplan tanpa melalui fase kalus, sedangkan organogenesis tidak langsung melibatkan pembentukan kalus sebelum berkembang menjadi organ baru (Cardoso *et al.,* 2020). Kedua mekanisme tersebut menunjukkan kemampuan sel tanaman untuk mengalami diferensiasi dan membentuk struktur baru sesuai dengan kondisi kultur yang diberikan.

Kultur kalus (kalogenesis) merupakan salah satu teknik kultur jaringan yang berperan dalam regenerasi tanaman melalui jalur tidak langsung. Kalus terbentuk ketika sel-sel somatik pada eksplan mengalami dediferensiasi sehingga menghasilkan kumpulan sel yang belum terorganisasi menjadi jaringan atau organ tertentu. Selanjutnya, sel-sel tersebut dapat mengalami perkembangan lebih lanjut melalui jalur organogenesis de novo maupun embriogenesis somatik, bergantung pada kondisi kultur dan respons regeneratifnya. Embriogenesis somatik merupakan proses pembentukan embrio dari sel somatik yang kemudian dapat berkembang menjadi tanaman utuh tanpa melalui fertilisasi. Proses tersebut melibatkan pembentukan sel dengan karakteristik embrionik dan kemampuan perkembangan yang mendukung regenerasi tanaman (Long *et al.,* 2022). Selain itu, embriogenesis somatik melalui jalur tidak langsung, yaitu dengan pembentukan kalus, berpotensi menghasilkan regeneran dalam jumlah besar dan mendukung upaya perbanyakan tanaman (Pereira *et al.,* 2019).

Induksi kalus dalam kultur jaringan merupakan proses pembentukan kumpulan sel yang belum terdiferensiasi dan dapat menjadi tahap awal regenerasi tanaman. Melalui proses diferensiasi dan regenerasi, kalus tertentu dapat membentuk tunas atau embrio somatik yang selanjutnya berkembang menjadi tanaman utuh. Oleh karena itu, induksi kalus dapat dimanfaatkan dalam perbanyakan tanaman secara in vitro, termasuk pada tanaman anggrek (Pasternak & Steinmacher, 2024). Secara fisiologis, pembentukan kalus berkaitan dengan aktivitas pembelahan sel yang meningkat sebagai respons terhadap kondisi kultur dan rangsangan pertumbuhan, sementara sel-selnya belum membentuk struktur jaringan atau organ yang terorganisasi.

Kondisi ini menghasilkan kumpulan jaringan yang umumnya bertekstur lunak dengan warna putih, krem, atau kehijauan (Fehér, 2019). Kalus memiliki karakteristik yang berbeda berdasarkan kemampuan regenerasinya. Kalus non-embriogenik tidak memiliki potensi embriogenesis somatik yang memadai,

sedangkan kalus embriogenik mampu membentuk embrio somatik dari sel-sel tubuh tanaman. Embrio somatik tersebut dapat melanjutkan perkembangan hingga menghasilkan tanaman baru (Heringer *et al.,* 2015). Salah satu faktor yang memengaruhi induksi kalus adalah keseimbangan ZPT dalam media kultur. Auksin, seperti NAA, dan sitokinin, seperti BAP, berperan dalam mengatur pembelahan serta perkembangan sel. Kombinasi keduanya dapat mendukung induksi kalus apabila diberikan pada konsentrasi dan rasio yang sesuai dengan respons fisiologis tanaman yang dikulturkan (Annisa *et al.,* 2023; Kaladharan *et al.,* 2024).



Gambar 3. Inisiasi pembentukan kalus (Rachmawati *et al.,* 2020)

Pembentukan kalus (kallogenesis) pada kultur jaringan tanaman berlangsung melalui serangkaian tahapan, mulai dari respons luka hingga proliferasi sel. Tahap awal terjadi ketika eksplan dipotong dan ditanam pada media kultur steril. Pelukaan tersebut memicu respons fisiologis pada jaringan di sekitar bekas sayatan, yang dapat ditandai dengan pembengkakan atau munculnya jaringan baru berwarna putih dan transparan. Tahap berikutnya melibatkan aktivasi pembelahan sel dan perubahan pola perkembangan sel, termasuk dediferensiasi pada sel yang memiliki kemampuan tersebut. Proses ini dikendalikan oleh berbagai faktor, terutama ketersediaan zat pengatur tumbuh dalam media. Auksin dan sitokinin merupakan dua kelompok

ZPT yang berperan penting dalam regulasi pembelahan dan proliferasi sel. Kondisi tertentu, konsentrasi auksin yang relatif lebih tinggi daripada sitokinin dapat mendorong pembentukan kalus, meskipun kebutuhan hormon berbeda antartanaman dan jenis eksplan (Ikeuchi *et al.,* 2017). Tahap selanjutnya adalah proliferasi, yaitu peningkatan jumlah sel melalui pembelahan berulang sehingga terbentuk massa jaringan yang belum terdiferensiasi menjadi organ tertentu. Massa jaringan tersebut berkembang menjadi kalus dengan karakteristik morfologi yang bervariasi, seperti warna putih, krem, atau hijau serta tekstur kompak atau remah. Selama pertumbuhan berlangsung, kalus memanfaatkan nutrisi yang tersedia dalam media. Ketika diperlukan, subkultur dilakukan dengan memindahkan kalus ke media baru untuk menyediakan nutrisi segar dan mendukung keberlanjutan proliferasi. Pergantian media juga dapat membantu mengurangi risiko penuaan dan pencokelatan jaringan yang berpotensi mengganggu pertumbuhan kalus (Pasternak & Steinmacher, 2024).

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan anggrek (Orchidaceae)

Keberhasilan kultur jaringan anggrek (Orchidaceae) ditentukan oleh interaksi berbagai faktor, terutama jenis eksplan, komposisi media, dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Eksplan merupakan bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan awal kultur untuk menghasilkan jaringan, organ, atau tanaman baru. Pada anggrek, eksplan dapat berasal dari jaringan vegetatif, seperti daun, akar, batang, mata tunas, pseudobulb, dan protocorm-like bodies (PLBs), maupun jaringan generatif, seperti biji dan protocorm.

Setiap jenis eksplan memiliki karakter fisiologis dan kapasitas regenerasi yang berbeda sehingga pemilihannya perlu disesuaikan dengan tujuan penelitian.Dapat dilihat (Tabel 1), penelitian kultur jaringan anggrek menggunakan beragam jenis eksplan, antara lain biji (Islam *et al.,* 2015; Kiaheirati *et al.,* 2024), daun (Pathak *et al.,* 2022; Coutiño-Cortés *et al.,* 2017), ujung akar (Li Chin Chai *et al.,* 2024), ujung tunas (Handini *et al.,* 2023), batang semu (umbi)/medulla pseudobulb *(Sood et al.,* 2023), pangkal plantlet (Rachmawati *et al.,* 2021; Rachmawati *et al.,* 2020), dan protocorm (bakal kecambah anggrek) (Karend *et al.,* 2025).

Keragaman tersebut menunjukkan bahwa pemilihan eksplan umumnya disesuaikan dengan tujuan kultur, ketersediaan bahan tanaman, dan kemampuan regenerasi jaringan yang digunakan. Dalam penelitian yang dikaji, biji, daun, pseudobulb, dan pangkal plantlet termasuk jenis eksplan yang banyak diteliti. Biji dan protocorm banyak dimanfaatkan dalam tahap perkecambahan dan regenerasi awal karena berpotensi menghasilkan banyak plantlet.

Namun, penggunaan biji memerlukan kondisi aseptik yang memadai, sedangkan variasi genetik pada keturunannya dapat terjadi apabila sumber biji berasal dari penyerbukan seksual. Protocorm juga memiliki jaringan yang aktif berkembang sehingga berpotensi mendukung pembentukan kalus, embriogenesis somatik, maupun regenerasi organ. Respons tersebut dipengaruhi oleh kondisi fisiologis jaringan serta jenis dan konsentrasi ZPT yang diberikan.

Cardoso *et al.* (2020) membahas potensi jaringan anggrek dalam mendukung induksi kalus embriogenik dan embriogenesis somatik, sedangkan PLBs banyak dimanfaatkan untuk perbanyakan karena memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi. Meskipun demikian, subkultur PLB secara berulang berpotensi meningkatkan variasi somaklonal (Parthibhan *et al.,* 2015). Selain biji dan PLB, ujung tunas, daun, akar, pseudobulb, dan pangkal plantlet juga memiliki potensi regenerasi yang berbeda. Eksplan ujung tunas, baik apikal maupun aksilar, dapat digunakan untuk perbanyakan klonal karena berpotensi mempertahankan karakter genetik tanaman induk, meskipun ketersediaannya relatif terbatas (Rineksane *et al.,* 2018). Daun dan akar dapat dimanfaatkan untuk induksi kalus, embriogenesis somatik, atau regenerasi tanaman, bergantung pada spesies dan kondisi kultur yang diterapkan (De & Sil, 2015).

Menurut penelitian Juddy *et al.,* (2017) potensi eksplan daun dalam pembentukan kalus dan embriogenesis, sementara ujung akar juga dapat dimanfaatkan untuk regenerasi PLB atau organ melalui respons jaringan terhadap kondisi kultur tertentu (Li Chin Chai *et al.,* 2024). Di sisi lain, jaringan medula pseudobulb berpotensi mendukung induksi kalus karena mengandung sel parenkim dan cadangan nutrisi yang menunjang pertumbuhan jaringan (Coutiño-Cortés *et al.,* 2017). Pangkal plantlet juga dapat digunakan sebagai sumber eksplan karena jaringan yang masih muda berpotensi memiliki kemampuan regenerasi yang baik (Sarmah *et al.,* 2024). Secara keseluruhan, setiap jenis eksplan memiliki kelebihan dan keterbatasan sehingga tidak terdapat satu jenis eksplan yang selalu paling unggul untuk seluruh tujuan kultur jaringan anggrek.

Biji dan protocorm lebih relevan untuk perkecambahan dan regenerasi awal, PLB untuk perbanyakan dalam jumlah besar, sedangkan ujung tunas dapat dipertimbangkan ketika kestabilan karakter tanaman induk menjadi prioritas. Adapun daun, akar, pseudobulb, dan pangkal plantlet dapat dimanfaatkan sesuai dengan kemampuan regenerasi jaringan dan sasaran penelitian. Oleh karena itu, pemilihan eksplan perlu mempertimbangkan karakter fisiologis, tingkat kematangan jaringan, potensi regenerasi, serta tujuan kultur yang ingin dicapai.

Media kultur merupakan komponen penting dalam kultur jaringan tanaman karena berfungsi menyediakan nutrisi yang dibutuhkan eksplan untuk tumbuh dan berkembang dalam kondisi in vitro. Media ini dapat berbentuk cairan maupun gel yang mengandung unsur hara makro dan mikro, vitamin, sumber karbon, serta zat pengatur tumbuh (ZPT) yang mendukung pembelahan dan diferensiasi sel hingga pembentukan organ tanaman.

Dalam kultur jaringan anggrek, beberapa media yang umum digunakan meliputi Murashige and Skoog (MS), Vacin and Went (VW), dan Knudson C (KC). Media MS dalam konsentrasi full strength maupun ½ MS banyak digunakan karena perbedaan konsentrasi nutrisinya memungkinkan penyesuaian kebutuhan eksplan pada tahap pertumbuhan tertentu. Media MS full strength mengandung unsur hara dengan konsentrasi penuh sesuai formulasi aslinya, sedangkan ½ MS memiliki konsentrasi unsur hara yang umumnya setengah dari formulasi tersebut. Kandungan garam mineral dan nitrogen yang relatif tinggi pada media MS dapat mendukung pertumbuhan vegetatif dan multiplikasi tunas, meskipun responsnya bergantung pada jenis tanaman dan kondisi kultur. Sementara itu, media VW dan KC juga digunakan dalam kultur anggrek, khususnya pada perkecambahan biji dan perkembangan awal protokorm, dengan efektivitas yang dipengaruhi oleh kebutuhan nutrisi spesifik masing-masing spesies (Hwang et al., 2024). Oleh karena itu, pemilihan media kultur perlu mempertimbangkan jenis eksplan, tahap perkembangan, dan kebutuhan nutrisinya agar pertumbuhan serta regenerasi tanaman dapat berlangsung secara optimal.

ZPT berperan penting dalam mengendalikan pertumbuhan dan perkembangan eksplan pada kultur jaringan, terutama dalam proses pembelahan sel, pembentukan kalus, serta regenerasi tunas dan akar. Auksin dan sitokinin

merupakan dua kelompok ZPT yang banyak digunakan dalam perbanyakan anggrek secara in vitro. Auksin, seperti IAA, IBA, dan NAA, berperan dalam pengaturan pembentukan akar dan dapat mendukung induksi kalus, sedangkan 2,4-D banyak digunakan untuk mendorong dediferensiasi sel dan pembentukan kalus pada tahap awal kultur. Penggunaan 2,4-D perlu dikendalikan karena konsentrasi yang tidak sesuai dapat menghambat proses regenerasi berikutnya (Pasternak & Steinmacher, 2024). Adapun sitokinin, seperti BAP, kinetin, zeatin, dan TDZ, berperan dalam merangsang pembelahan sel dan pembentukan tunas. Respons eksplan terhadap kedua kelompok ZPT tersebut ditentukan oleh konsentrasi dan keseimbangannya dalam media kultur. Kombinasi auksin dan sitokinin, termasuk NAA dan BAP, dapat memengaruhi arah morfogenesis eksplan, baik menuju pembentukan tunas, akar, maupun kalus.

NAA dan BAP merupakan zat pengatur tumbuh yang sering dikombinasikan dalam kultur jaringan untuk memengaruhi respons morfogenesis eksplan. NAA berperan sebagai auksin sintetik yang mendukung dediferensiasi sel, sedangkan BAP berfungsi sebagai sitokinin yang merangsang pembelahan sel dan proliferasi jaringan. Dalam induksi kalus, rasio kedua zat pengatur tumbuh tersebut menjadi salah satu faktor yang menentukan arah perkembangan eksplan. Konsentrasi auksin yang relatif lebih tinggi daripada sitokinin sering dikaitkan dengan peningkatan pembentukan kalus.

Menurut Kiaheirati *et al.* (2024) efektivitas auksin pada kisaran 0,5–2 mg/L ketika dikombinasikan dengan sitokinin berkonsentrasi rendah. Akan tetapi, peningkatan konsentrasi auksin secara berlebihan dapat mengubah respons morfogenesis ke arah pembentukan akar (Li Chin Chai *et al.,* 2024). Meskipun demikian, hasil penelitian menunjukkan bahwa dominasi auksin bukan merupakan satu-satunya kondisi yang memungkinkan pembentukan kalus. Pathak *et al.,* (2022) melaporkan regenerasi kalus pada 100% eksplan menggunakan kombinasi 10.6 µM (1,97 mg/L) NAA + 8.8 µM (1,98 mg/L) BAP. Li Chin Chai et al. (2024) juga memperoleh persentase pembentukan kalus sebesar 66,67% pada kombinasi 2,5 mg/L NAA dan 1,0 mg/L BAP. Sebaliknya, Islam et al. (2015) menemukan pertumbuhan kalus terbaik (1.98 cm × 1.01 cm setelah 45 hari) pada kombinasi 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, sementara Sood *et al.,* (2023), melaporkan frekuensi induksi sebesar 55,55% pada kombinasi 1,0 mg/L BAP dan 0,5 mg/L NAA.

Temuan tersebut menunjukkan bahwa dominasi sitokinin tetap dapat mendukung pembentukan kalus pada kondisi kultur tertentu. Variasi respons juga terlihat pada penggunaan auksin selain NAA. Coutiño-Cortés et al. (2017), melaporkan persentase pembentukan kalus sebesar 78,75% pada kombinasi BAP dan 2,4-D dengan konsentrasi masing-masing 1,0 mg/L. Sementara itu, Handini et al. (2023) memperoleh persentase pembentukan kalus sebesar 33,33% menggunakan 1 mg/L 2,4-D dan 0,5–1,5 mg/L TDZ. Dengan demikian, pembentukan kalus tidak dapat dijelaskan hanya berdasarkan rasio konsentrasi auksin dan sitokinin, tetapi perlu mempertimbangkan jenis zat pengatur tumbuh, genotipe tanaman, kondisi eksplan, dan tujuan regenerasi. Penggunaan 2,4-D sebagai alternatif NAA dapat dipertimbangkan dalam pengembangan media induksi kalus, tetapi efektivitasnya tetap perlu dievaluasi pada sistem kultur yang diteliti (Kiaheirati *et al.,* 2024).

Penggunaan kombinasi sitokinin dalam kultur jaringan menunjukkan potensi untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik, meskipun responsnya bergantung pada komposisi medium dan konsentrasi ZPT. Rachmawati et al. (2020) melaporkan bahwa kombinasi TDZ 1,5 mg/L dan BAP 0,5 mg/L menghasilkan laju inisiasi kalus embriogenik tertinggi sebesar 38,3% serta proliferasi kalus hingga 83,1%. Pada penelitian tahun 2021, kombinasi TDZ 1 mg/L dan BAP 0,5 mg/L yang dilengkapi 150 mg/L L-glutamin menghasilkan inisiasi kalus embriogenik sebesar 100% (Rachmawati *et al.,* 2021)**.** L-Glutamin adalah salah satu asam amino yang paling sering digunakan dalam kultur jaringan tanamankarena memiliki peran penting pada berbagai tahapan.

Senyawa ini digunakan untuk merangsang pembentukan dan pertumbuhan kalus embriogenik. L-Glutamin membantu proses dediferensiasi sel, pembelahan sel (proliferasi), serta mempertahankan kemampuan embriogenik dari eksplan. Selain itu, L-Glutamin sangat dibutuhkan dalam biosintesis asam amino dan protein, serta berperan tidak langsung dalam

pembentukan auksin yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan sel tanaman (Rachmawati *et al.,* 2021). Meskipun auksin memiliki peran utama dalam proses pembentukan kalus, kombinasi dengan sesama hormon sitokinin juga terbukti mampu merangsang terbentuknya kalus embriogenik. Secara fisiologis, TDZ dapat merangsang respons regeneratif melalui pengaturan aktivitas hormon dan proliferasi sel, sehingga banyak dimanfaatkan dalam induksi kalus embriogenik, PLB, dan embriogenesis somatik. Sebaliknya, BAP lebih umum diaplikasikan untuk multiplikasi tunas. Kombinasi keduanya berpotensi memberikan respons yang saling melengkapi, tetapi tidak selalu menghasilkan peningkatan regenerasi karena efektivitasnya dipengaruhi oleh genotipe tanaman, jenis eksplan, konsentrasi hormon, dan kondisi kultur (Juddy *et al.,* 2017; Mose *et al.,* 2017).

Tabel 1. Pengaruh NAA dan BAP terhadap induksi kalus pada anggrek (Orchidacea)

Spesies	Eksplan	Komposisi media	Kombinasi dan konsentrasi ZPT	Hasil optimal	Referensi
Cymbidium finlaysonianum Lindl	Biji	MS	2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA	Perkembangan kalus terbaik, meningkatkan ukuran kalus 1.98 cm × 1.01 cm setelah 45 hari	(Islam *et al.,* 2015)
Vanda cristata Wall. ex Lindl	Daun	KC	10,6 µM (1,97 mg/L) NAA + 8,8 µM (1,98 mg/L) BAP	100% eksplan memulai regenerasi kalus.	(Pathak *et al.,* 2022)
Vanilla planifolia Andrews	Ujung akar	MS	2.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BAP	Pertumbuhan kalus tertinggi sebesar 66,67%	(Li Chin Chai *et al.,* 2024)
Paphiopedilum glaucophyllum	Ujung tunas	½ MS	1 mg/L 2,4 D, + 1.5 mg/L TDZ	Persentase kalus sebesar 33,33% dan jumlah rerata kalus per eksplan sebanyak 1,33	(Handini *et al.,* 2023)
Guarianthe skinneri (Bateman) Dressler & WE Higgins	Daun	MS	1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BAP	Pembentukan kalus yang optimal seebesar 78,75%	(Coutiño-Cortés *et al.,* 2017)
Phalaenopsis Var.'Raiza Agrihorti	Pangkal plantlet	MS	1,0 mg/L TDZ dan 0,5 mg/L BAP + 150 mg/L L-Glutamin	Inisiasi pembentukan kalus embriogenik hingga 100%	(Rachmawati *et al.,* 2021)
Phalaenopsis amabilis (L.) Blume	Protocorm	MS	3 ppm BAP	Rerata jumlah embrio somatik tertinggi mencapai 65,00 embrio per eksplan.	(Karend *et al.,* 2025)
Dendrobium 'Balithi CF22-58	Pangkal plantlet	MS	1,5 mg/L TDZ + 0,5 mg/L BAP	Inisiasi kalus embriogenik mencapai persentase tertinggi sebesar 38,3%, dengan proliferasi kalus sebesar 83,1%.	(Rachmawati *et al.,* 2020)
Dactylorhiza hatagirea (D. Don) Soó	Batang semu (umbi)	MS	0.5 mg/L NAA + 1 mg/L BAP	Induksi kalus terjadi pada 55,55% eksplan, dengan inisiasi kalus tercepat pada hari ke-73,3.	(Sood *et al.,* 2023)
Phalaenopsis circus	Biji	MS	0.5 mg/L 2,4 D + 2.0 mg/L NAA	Jumlah embrio somatik tertinggi mencapai 12,33 embrio per eksplan.	(Kiaheirati *et al.,* 2024)

Hasil penelitian Karend et al. (2025), yang menunjukkan rata-rata jumlah embrio somatik sebesar 65,00 embrio per eksplan pada perlakuan BAP tunggal 3 ppm, memberikan indikasi bahwa penambahan auksin eksogen tidak selalu menjadi prasyarat bagi proliferasi embrio somatik. Respons tersebut diduga berkaitan dengan kemampuan BAP dalam merangsang pembelahan sel dan mendukung perkembangan struktur regeneratif pada anggrek, sebagaimana dijelaskan oleh Cui et al. (2017). Selain pengaruh ZPT eksogen, keberadaan hormon endogen dalam jaringan eksplan juga berpotensi berkontribusi terhadap respons morfogenesis yang terbentuk. Hal ini menegaskan bahwa respons kultur jaringan merupakan hasil interaksi antara perlakuan hormonal dan kondisi fisiologis eksplan. Oleh karena itu, meskipun auksin secara umum dikaitkan dengan induksi kalus dan sitokinin dengan proliferasi sel serta organogenesis, pola respons tersebut tidak dapat digeneralisasi untuk seluruh anggrek. Optimasi ZPT perlu mempertimbangkan genotipe, jenis eksplan, keseimbangan hormonal, dan komponen medium kultur agar sesuai dengan tujuan regenerasi yang diinginkan.

Berdasarkan kajian terhadap sejumlah penelitian terdahulu, keberhasilan induksi kalus pada anggrek menunjukkan variasi antarspesies. Perbedaan tersebut dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk jenis eksplan dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan. Setiap eksplan memiliki keseimbangan hormon endogen yang dapat memengaruhi responsnya terhadap pemberian ZPT eksogen. Ketidakseimbangan antara hormon endogen dan ZPT yang diberikan dapat menghambat pertumbuhan, mengubah arah regenerasi, serta memicu stres fisiologis hingga menyebabkan nekrosis jaringan (Pasternak & Steinmacher, 2024). Oleh karena itu, optimasi konsentrasi auksin dan sitokinin diperlukan untuk memperoleh kondisi kultur yang optimal bagi induksi kalus. Berdasarkan penelitian-penelitian yang dikaji, konsentrasi NAA sebesar 0,5–2,5 mg/L dan BAP sebesar 0,5–2,0 mg/L menunjukkan potensi dalam menginduksi kalus, baik melalui pemberian tunggal, kombinasi keduanya, maupun kombinasi dengan ZPT lain, seperti 2,4-D dan TDZ. Namun, efektivitas konsentrasi tersebut tetap bergantung pada spesies anggrek, jenis eksplan, dan kombinasi ZPT yang digunakan.

Kesimpulan

Studi literatur menunjukkan bahwa NAA dan BAP berpotensi digunakan untuk menginduksi kalus pada berbagai spesies anggrek, dengan kisaran konsentrasi yang dilaporkan efektif sebesar 0,5–2,5 mg/L NAA dan 0,5–2,0 mg/L BAP. Efektivitas kombinasi tersebut bergantung pada kebutuhan fisiologis setiap spesies serta komposisi ZPT yang digunakan. NAA diduga berperan penting dalam merangsang dediferensiasi dan pembelahan sel pada tahap awal induksi, sedangkan BAP mendukung aktivitas proliferasi sel. Namun, respons eksplan juga dipengaruhi oleh kandungan hormon endogen yang dapat berinteraksi dengan ZPT eksogen, sehingga menentukan keberhasilan pembentukan dan perkembangan kalus. Meskipun demikian, kajian mengenai hubungan antara komposisi NAA dan BAP dengan kondisi fisiologis, viabilitas, serta kemampuan regeneratif kalus masih perlu dikembangkan. Evaluasi yang hanya didasarkan pada persentase induksi belum dapat menunjukkan kualitas kalus yang dihasilkan maupun potensinya untuk beregenerasi menjadi tanaman. Dengan demikian, penelitian selanjutnya perlu mengintegrasikan pengamatan keberhasilan induksi dengan evaluasi viabilitas dan kemampuan regenerasi kalus, sekaligus mempertimbangkan pengaruh hormon endogen eksplan. Hal ini penting untuk mengembangkan protokol yang spesifik bagi setiap spesies dan lebih efektif dalam mendukung perbanyakan massal anggrek.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah berkontribusi dalam penyusunan artikel ini.

Referensi

Annisa, R. R. R., Setiaji, A., Purnomo, Sutikno, & Sasongko, A. B. (2023). In vitro regeneration of hybrid *Dendrobium* sect. Spatulata through pseudobulb segment culture. *Comunicata Scientiae*, *14*, e3679–e3679.

Benke, A., Krishna, R., Khandagale, K., Gawande, S., Shelke, P., Dukare, S., & Mahajan, V. (2023). Efficient Elimination of Viruses from Garlic Using a Combination of Shoot Meristem Culture, Thermotherapy, and Chemical Treatment. *Patogen*, *12*(1), 129. DOI: 10.3390/pathogens12010129

Cardoso, J. C., Zanello, C. A., & Chen, J. T. (2020). An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3). DOI: https://doi.org/10.3390/ijms21030985

Coutiño-Cortés, A. G., Bertolini, V., Iracheta-Donjuan, L., Ruíz-Montoya, L., & Valle-Mora, J. F. (2017). In vitro callogenesis induction of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae). *Acta Agronomica*, *66*(2), 254–259. DOI: 10.15446/acag.v66n2.57982

Cui, Y., Zhao, P., An, H., Lv, N., Zhang, Z., Pei, W., & Wang, W. (2017). Initiation and Cytological Aspects of Somatic Embryogenesis in *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *HortScience*, *52*(8), 1111–1116. DOI: 10.21273/HORTSCI10525-17

De, K. K., & Sil, S. (2015). Proto corm-like bodies and plant regeneration from foliar explants of *Coelogyne Flaccida*, a horti culturally and medicinally important endangered orchid of Eastern Himalaya. *Lankesteriana*, *15*(2), 151–158. DOI: 10.15517/lank.v15i2.20747

Dwiyani, R., Fitriani, Y., & Mercuriani, I. S. (2022). The Alternative Media Supporting the Protocorm and Plantlet Growth of the Indonesian Black Orchid (*Coelogyne pandurata* Lindl .) Grown In Vitro. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*, *37*(1),152–160. DOI: 10.20961/carakatani.v37i1.55956

Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, *248*(1), 1–18. DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1

Fatahi, M., Vafaee, Y., Tahir, N. A. R., & Khorshidi, J. (2022). Large-Scale In Vitro Multiplication and Phytochemical Analysis of *Himantoglossum affine* (Boiss.) Schltr.: An Endangered Euro-Mediterranean Terrestrial Orchid. *Diversity*, *14*(12), 1137. DOI: 10.3390/d14121137

Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, *10*, 536. DOI: 10.3389/fpls.2019.00536

Handini, E., Sianturi, R. U. D., Aprilianti, P., Isnaini, Y., Semiarti, E., Rianawati, S., & Solihah, S. M. (2023). Modification of In Vitro Culture Method of *Paphiopedilum glaucophyllum* for Callus Induction. *Plant Breeding and Biotechnology*, *11*(4), 242–252. DOI: 10.9787/PBB.2023.11.4.242

Hartati, S., Arniputri, R. B., Soliah, L. A., & Cahyono, O. (2017). Effects of organic additives and naphthalene acetid acid (NAA) application on the in vitro growth of Black orchid hybrid (*Coelogyne pandurata* Lindley). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *23*(6), 951–957.

Hartati, S., Retna, B. A., Brigita, R. H., & Cahyono, O. (2022). The Effect of Auxin and Cytokinin on Black Orchid Hybrid (*Coelogyne pandurata* Lindley) in Vitro. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, *12*(3), 981–986. DOI: 10.18517/ijaseit.12.3.14192

Heringer, A. S., Barroso, T., Macedo, A. F., Santa-Catarina, C., Souza, G. H. M. F., Floh, E. I. S., De Souza-Filho, G. A., & Silveira, V. (2015). Label-free quantitative proteomics of embryogenic and non-embryogenic callus during sugarcane somatic embryogenesis. *PLoS ONE*, *10*(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0127803

Humaira, M., Purwito, A., Pascasarjana, S., & Pertanian, F. (2020). Multiplikasi Tunas *In Vitro* Anggrek Phalaenopsis dan Analisis Keragaman Genetik dengan Marka SNAP. *Jurnal Agronomi Indonesia*, *48*(1), 59–67. DOI:10.24831/jai.v48i1.29149

Hwang, J. E., Park, H. Bin, Jeon, D. Y., Park, H. J., Kim, S., Lee, C. W., Kim, Y. J., & Yoon, Y. J. (2024). Effect of Different Basal Media and Organic Supplements on In Vitro Seedling Development of the Endangered Orchid Species *Dendrobium*

moniliforme (L.) Swartz. *Plants*, *13*(19). DOI: 10.3390/plants131927211

Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Lambolez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., & Sugimoto, K. (2017). Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes. *Plant Physiology*, *175*(3), 1158–1174. DOI: 10.1104/pp.17.01035

Islam, T., Bhattacharjee, B., Islam, S. M. S., Uddain, J., & Subramaniam, S. (2015). Axenic seed culture and in vitro mass propagation of Malyasian wild orchid *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. *Pakistan Journal of Botany*, *47*(6), 2361–2367.

Juddy, E., Jainol, & Gansau, J. A. (2017). Embryogenic Callus Induction from Leaf Tip Explants and Protocorm-Like Body Formation and Shoot Proliferation of *Dimorphorchis lowii* : Borneon Endemic Orchid. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, *39*(1), 1–10. DOI: 10.17503/agrivita.v39i1.895

Kaladharan, S., Mariappan, M., & Thiruppathi, S. K. (2024). An effective in vitro propagation of *Coelogyne mossiae* Rolfe: An endangered endemic orchid of Western Ghats, India. *South African Journal of Botany*, *173*, 217–224. DOI: 10.1016/j.sajb.2024.08.026

Karend, A. H. A., Setiari, N., Nurchayati, Y., & Rashid, F. A. A. (2025). Somatic Embryo Enhancing of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Orchid with 6-Benzyl Amino Purine (BAP). *Jurnal Riset Biologi Dan Aplikasinya*, *7*(1), 88–98. DOI: 10.26740/jrba.v7n1.p88-98

Kiaheirati, H., Hashemabadi, D., & Kaviani, B. (2024). In vitro propagation of the orchid *Phalaenopsis circus* via organogenesis and somatic embryogenesis using protocorm and thin cell layer explants. *Italian Botanist*, *18*, 29–50. DOI: 10.3897/italianbotanist.18.123376

Koene, F. M., Amano, & Ribas, L. L. F. (2019). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, *121*, 83–91. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.07.019

Kumar, A., Chauhan, S., Rattan, S., Warghat, A. R., Kumar, D., & Bhargava, B. (2022). In vitro propagation and phyto-chemical assessment of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: An orchid of pharma-horticultural importance. *South African Journal of Botany*, *144*, 261–269. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.06.030

Li Chin Chai, Peter G. Alderson, & Chiew Foan Chin. (2024). Exogenous Cytokinin Induces Callus and Protocorm-Like-Bodies (PLBs) Formation in In Vitro Root Tips of *Vanilla planifolia* Andrews. *Tropical Life Sciences Research*, *35*(1), 235–258. DOI: https://doi.org/10.21315/tlsr2024.35.1.13

Long, Y., Yang, Y., Pan, G., & Shen, Y. (2022). New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, *13*. DOI: 10.3389/fpls.2022.926752

Mose, W., Indrianto, A., Purwantoro, A., & Semiarti, E. (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. DOI: 10.1016/j.hjb.2017.11.005

Parthibhan, S., Rao, M. V., & Senthil Kumar, T. (2015). In vitro regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley - An imperiled orchid. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *13*(2), 227–233. DOI: 10.1016/j.jgeb.2015.07.001

Pasternak, T. P., & Steinmacher, D. (2024). Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro. *Plants*, *13*(2), 327. DOI: 10.3390/plants13020327

Pathak, P., Sunita, Kumari, A., Thakur, B., Vasundhra, & Madhu. (2022). Regeneration competence of an endangered orchid, *Vanda cristata* Wall. ex Lindl. using leaf explants: A study in vitro. *South African Journal of Botany*, *151*, 1018–1024. DOI: 10.1016/j.sajb.2022.10.054

Pereira, J. A. F., Ferreira, L. T., De Morais, M. B., & Ulisses, C. (2019). Somatic embryos from *Phalaenopsis* classic Spotted Pink (Orchidaceae) protocorms. *Ciencia Rural*,

49(7). DOI: 10.1590/0103-8478cr20180822

Rachmawati, F., Badriah, D. S., & Marwoto, B. (2021). Pengaruh Jenis Eksplan dan Asam Amino pada Inisiasi dan Proliferasi Kalus Embriogenik *Phalaenopsis* Var. 'Raiza Agrihorti.' *Jurnal Hortikultura*, *31*(1), 11. DOI: 10.21082/jhort.v31n1.2021.p11-20

Rachmawati, F., Permanik, D., Mayang, R. B., & Winarto, B. (2020). In Vitro Propagation Protocol of *Dendrobium* 'Balithi CF22-58' via Indirect Somatic Embryogenesis. *Jurnal Hortikultura*, *29*(2), 137. DOI: 10.21082/jhort.v29n2.2019.p137-146

Rineksane, I. A., Nafiah, S. S., & Dewi, S. S. (2018). The Combination of Rice Water and BAP Enhances the Multiplication of *Grammatophyllum speciosum*. *Planta Tropika: Journal of Agro Science*, *6*(2), 92–99. DOI: 10.18196/pt.2018.085.92-99

Sarmah, D., Mohapatra, P. P., Seleiman, M. F., Mandal, T., Mandal, N., Pramanik, K., & Wasonga, D. O. (2024). *Efficient regeneration of in vitro derived plants and genetic fidelity assessment of Phalaenopsis orchid*. *Frontiers in Sustainable Food Systems, 8*, 1359486. DOI: 10.3389/fsufs.2024.135948

Šmeringai, J., Schrumpfová, P. P., & Pernisová, M. (2023). Cytokinins – regulators of de novo shoot organogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1239133. DOI: 10.3389/fpls.2023.1239133

Sood, A., Thakur, K., Joshi, R., Kumar, D., & Warghat, A. R. (2023). Comparative quantification of dactylorhin among different wild tissues and in vitro cultures of *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don), an endangered medicinal orchid of Western Himalayas. *South African Journal of Botany*, *153*, 172–177.

Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., & Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*, *63*(1), 228–243. DOI: 10.1111/jipb.12972

Tiwari, P., Sharma, A., Bose, S. K., & Park, K. (2024). Advances in Orchid Biology : Biotechnological Achievements , Translational Success , and Commercial Outcomes. *Hortikultura*, *10*(2), 152. DOI: 10.3390/horticulturae10020152

Wang, Y., Wang, H., Ye, C., Wang, Z., Ma, C., Lin, D., & Jin, X. (2024). Progress in systematics and biogeography of Orchidaceae. *Plant Diversity*, *46*(4), 425–434. DOI: 10.1016/j.pld.2024.05.002

Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, *40*(4), 196–208. DOI: 10.1016/j.pld.2018.06.003

Zhao, D. K., Selosse, M. A., Wu, L., Luo, Y., Shao, S. C., & Ruan, Y. L. (2021). Orchid Reintroduction Based on Seed Germination-Promoting Mycorrhizal Fungi Derived From Protocorms or Seedlings. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 1–11. DOI: 10.3389/fpls.2021.701152