

Peran Chitosan Sebagai Pemacu Pertumbuhan Kultur Anggrek *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm. Secara *In Vitro*

VERENA AGUSTINI*, IRMA RAHAYU, LEONARDO A. NUMBERI, ZIYADATUN NI'MAH

Program Studi Biologi, FMIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura

Diterima: 10 Desember 2019 – Disetujui: 20 Januari 2020
© 2020 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

The effect of chitosan on micropropagation of *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm was observed. The media used was Vacin and Went (VW) modified with the addition of coconut water and given chitosan with several concentrations. The study was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory of the Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Cenderawasih University for 6 months, from April to September 2019. Experiments using a Completely Randomized Design (CRD) of 8 treatments with 3 explants in each bottle for total 3 bottle as a replication. The total explants used in this experiment was 72 explants. The concentration of chitosan were 0, 1, 5, 10, 15, 20, 40 and 50 % separately. Observation data were analyzed using ANOVA, if there were significant differences followed by DMRT at the 5% level. Observation variables included number and length of roots, number and length of leaves. The results showed that giving chitosan 10% had a maximum effect on the number of roots and number of leaves, 6.67 and 4.67. As for the highest leaf length of 17.43 mm and the longest root length 19.21 mm were in the media with the addition of chitosan concentration of 15%. The observations showed that chitosan had a positive influence on the growth and development of orchids *D. lasianthera* plantlet *in vitro*.

Key words: Chitosan, orchid, Vacin and Went, plantlet.

PENDAHULUAN

Orchidaceae dikenal sebagai tanaman ornamental karena variasi bunga yang sangat banyak dan menarik, baik anggrek spesies maupun silangan. Bunga anggrek merupakan salah satu komoditi tanaman ornamental yang cukup tinggi nilai ekonominya. Salah satu genus yang besar jumlah jenis dan penyebarannya di Papua adalah *Dendrobium* (Millar, 1999). Di dunia, genus ini menduduki urutan kedua dalam jumlah spesiesnya yaitu sekitar 1500 spesies

setelah *Bulbophyllum*.

Dendrobium lasianthera J.J.Sm merupakan anggrek endemik Pulau New Guinea di Indonesia yang masuk dalam Peraturan Pemerintah No 7 tahun 1999 sebagai spesies tanaman yang dilindungi, dalam CITES masuk Appendix II di mana jual beli anggrek ini diatur secara internasional. Banyaknya alih fungsi hutan yang cukup signifikan di Papua, sangat berdampak terhadap keberadaan anggrek epifit *D. lasianthera*. Menurut laporan Charles Tawaru, juru kampanye hutan Papua yang dirilis di laman Greenpeace Indonesia pada 23 Agustus 2011, luas hutan Papua berkurang sekitar lebih dari 10 juta ha dalam waktu 3 tahun. Hutan Provinsi Papua mengalami deforestasi sebesar 143.680 rata-rata setiap tahunnya, sedangkan Provinsi Papua Barat sebesar 25% nya yaitu 293.000 ha.

* Alamat korespondensi:

Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas
Cenderawasih, Jayapura. Jl. Kamp Wolker, Perumnas 3,
Waena Jayapura, Papua.
E-mail: verena.agustini@gmail.com

Tindakan penyelamatan keragaman berbagai spesies makhluk hidup epifit pada habitat pohon dalam hutan adalah dengan memindahkan habitat mereka ke lahan yang terjaga seperti Kebun Raya atau Hutan Kota. Langkah selanjutnya usaha untuk membudidayakan jenis-jenis tersebut. Khusus untuk anggrek, teknik yang banyak dilakukan adalah dengan kultur jaringan. Teknik ini mampu menghasilkan tanaman yang seragam dan dalam jumlah banyak. Perbanyak tanaman dengan metode kultur jaringan memberi peluang besar untuk menghasilkan bibit tanaman dalam waktu singkat. Kultur jaringan sangat sesuai untuk perbanyak anggrek secara masal melalui biji. Biji anggrek dengan ukuran yang sangat kecil tidak memiliki endosperm sebagai tempat menyimpan cadangan makanan. Penggunaan eksplan biji anggrek secara *in vitro* akan mampu menyediakan sumber makanan yang dibutuhkan oleh biji anggrek melalui media tanam.

Salah satu kunci utama keberhasilan dalam teknik kultur jaringan tumbuhan adalah media. Komposisi media menjadi komponen penting untuk pertumbuhan eksplan termasuk anggrek. Selain media dasar seperti Murashige & Skoog (MS) dan Vacin & Went (VW), penambahan unsur kimia lain maupun Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) juga menjadi faktor pemacu pertumbuhan eksplan secara *in vitro*. Penambahan unsur Si pada media kultur anggrek *Dendrobium moniliforme* mampu meningkatkan ketahanan terhadap temperatur yang rendah, pada *Cattleya loddigesii* dan *Phalaenopsis* hybrid dapat meningkatkan jumlah dan pertumbuhan tunas (Sivanesan & Park, 2014). Media kultur anggrek *Coelogyne celebensis* yang diperkaya dengan penambahan air kelapa mampu meningkatkan pertumbuhan protocorm.

Pengaruh yang signifikan juga nampak pada penambahan pepton dalam media VW terhadap perkecambahan biji dan pembentukan tunas *D. lasianthera* secara *in vitro* (Utami *et al.*, 2017). Bahan lain yang juga mulai

diaplikasikan ke dalam media kultur adalah chitosan. Selain digunakan sebagai stimulator pertumbuhan tanaman, chitosan banyak diaplikasikan untuk treatment air limbah, limbah pulp dan kertas, industri obat dan kosmetik, bioteknologi, industri makanan dan pakan ternak.

Aplikasi chitosan dalam bidang pertanian dapat mengurangi stress lingkungan karena kekeringan atau defisiensi hara, meningkatkan viabilitas benih, vigor dan produksi. Aplikasi kitosan juga mampu meningkatkan kandungan klorofil sehingga meningkatkan efektifitas fotosintesa (Subiksa, 2013). Di samping itu, chitosan berperan sebagai pupuk untuk memperkuat pertumbuhan (Anisa, 2014). Chitosan mempunyai cakupan penggunaan yang luas, dengan afinitas yang tinggi tidak toksik, mudah didegradasi, dan bahan baku berasal dari alam. Chitosan mengatur sistem kekebalan tanaman dan menyebabkan ekskresi enzim pelawan. Lebih dari itu chitosan tidak hanya mengaktifkan sel, tetapi juga meningkatkan kemampuan pertahanan melawan penyakit dan serangga. Chitosan mempunyai efek pada system pertanian, misalnya berperan sebagai sumber karbon bagi mikroba di dalam tanah, mempercepat proses transformasi senyawa organik menjadi senyawa anorganik dan membantu sistem perakaran pada tanaman untuk menyerap lebih banyak nutrisi dari tanah. Chitosan diserap oleh akar setelah diuraikan oleh bakteri di dalam tanah. Chitosan juga mengandung zat pengatur tumbuh seperti giberelin: GA3, GA5, GA7, Auksin (*Indole Acetic Acid*) dan Sitokinin (Kinetin dan Zeatin) (Anonim, 2013). Selain itu, Chitosan juga digunakan sebagai pengawet (Murtini & Kusmarwati, 2006; Harjanti, 2014) dan pelapis buah (Benhabiles *et al.*, 2013; Trisnawati *et al.*, 2013; Nur'aini & Apriyani, 2015).

Sejumlah besar chitosan terdapat pada kulit udang dan kulit kepiting. Chitosan semakin banyak digunakan di bidang agrikultur, karena selain mampu mamacu perkembangan dan pertumbuhan tanaman

sekaligus bersifat ramah lingkungan. Pada budidaya anggrek baik dalam tahap *in vitro*, aklimatisasi, maupun tahap pemeliharaan di dalam green house, penggunaan chitosan mulai banyak digunakan.

Pada pertumbuhan *Dendrobium* hasil hibridisasi penambahan chitosan pada media kultur mampu mempercepat pertumbuhan sekaligus mengurangi tingkat kematian plantlet sebulan setelah rekultur (Pornpienpakdee *et al.*, 2010). Kombinasi chitosan dan hormon tumbuh mempunyai pengaruh positif pada propagasi *Phalaenopsis* (Samarfard *et al.*, 2014). Plantlet anggrek macan dalam tahap aklimatisasi yang disemprot menggunakan larutan yang mengandung chitosan mampu meningkatkan indeks stomata daun, sehingga proses fotosintesis meningkat dan berpengaruh signifikan pada pertumbuhan plantlet (Pitoyo *et al.*, 2015).

Efek chitosan dalam beberapa tingkatan konsentrasi pada tahap perakaran plantlet *D. lasianthera* J.J.Sm. akan diamati apakah ada pengaruh positif dalam pertumbuhan khususnya pada akar dan plantlet secara keseluruhan dalam skala laboratorium. Perlakuan terbaik dalam penelitian ini dapat dimanfaatkan dalam meningkatkan keberhasilan dan mempercepat pertumbuhan kultur anggrek secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Persiapan dan Kultur Eksplan

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah plantlet anggrek *D. lasianthera* J.J.Sm. Tahap multiplikasi umur 6 bulan (sumber plantlet adalah hasil kultur biji secara *in vitro*). Plantlet merupakan koleksi Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Cenderawasih.

Plantlet hasil kultur pada media multiplikasi dipindahkan ke media perakaran sesuai perlakuan secara aseptik di dalam LAF. Setiap botol berisi 3 eksplan. Selanjutnya botol diberi label sesuai perlakuan dan tanggal penanaman. Botol kultur

diinkubasi dalam rak ruang kultur dengan suhu 25 °C dan pencahayaan dengan lampu fluoresen 20 watt yang dipasang pada masing-masing rak. Ruang kultur dijaga tetap steril dengan dengan penyemprotan alkohol 70 % setiap hari.

Pembuatan Media dan Aplikasi Chitosan

Media dasar yang digunakan adalah media Vacin & Went yang terdiri dari unsur makro, mikro ditambah dengan gula, air kelapa dan arang aktif kemudian dilarutkan kedalam aquadest diaduk menggunakan magnetic stirrer sampai larut semua bahan. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH =5,8. Apabila pH < 5,8 ditambahkan NaOH, sebaliknya apabila pH larutan > 5,8 ditambahkan HCl. Setelah pH tepat 5,8 ditambahkan larutan chitosan dengan beberapa konsentrasi yaitu 0, 1, 5, 10, 15, 20, 40, dan 50%.

Media dituang ke botol kultur yang sudah disterilkan 30 ml per botol, kemudian ditutup dengan penutup botol dan disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121 °C, tekanan 17,5 psi selama 20 menit. Komposisi media adalah M0 = media + chitosan 0%, M1 = media + chitosan 1%, M2 = media + chitosan 5%, M3 = media + chitosan 10%, M4 = media + chitosan 15 %, M5 = media + chitosan 40%, M6 = media + chitosan 50%.

Pengumpulan dan Analisis Data

Data diambil pada akhir penelitian dengan parameter yang diambil adalah jumlah dan panjang daun, serta jumlah dan panjang akar. Penelitian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 8 perlakuan termasuk kontrol dan 3 kali ulangan, setiap botol berisi 3 eksplan (9 eksplan), total eksplan berjumlah 72.

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (Anova), apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan chitosan pada media perakaran anggrek *D. lasianthera* memberikan pengaruh nyata pada pertumbuhan akar dan daun plantlet anggrek yang berasal dari kultur biji *D. lasianthera* koleksi laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi, Universitas Cenderawasih.

Pertumbuhan Daun

Tabel 1. Rata-rata panjang dan jumlah daun setelah 4 bulan dalam beberapa konsentrasi chitosan yang ditambahkan ke dalam media.

No.	Chitosan (%)	Panjang daun (mm)	Jumlah Daun
1	0	4,70 a	2,00 a
2	1	6,99 b	3,33 b
3	5	10,14 c	3,78 c
4	10	15,23 d	4,67 d
5	15	17,43 f	4,44 cd
6	20	13,85 d	3,89 bc
7	40	17,18 f	3,56 b
8	50	13,74 d	4,22 c

Ket.: Angka pada kolom yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan hasil tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf $\alpha = 5\%$.

Tabel 2. Rata-rata panjang dan jumlah akar dalam media yang diperkaya dengan beberapa konsentrasi chitosan yang berbeda.

No.	Chitosan (%)	Panjang akar (mm)	Jumlah akar
1.	0	4,00 a	1,56 a
2.	1	6,37 b	2,22 a
3.	5	6,97 b	3,11 b
4.	10	14,94 e	6,67 e
5.	15	19,97 f	4,67 c
6.	20	11,97 d	3,11 b
7.	40	9,15 c	5,33 d
8.	50	10,54 cd	5,00 cd

Ket.: Angka pada kolom yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan hasil tidak berbeda nyata pada Uji Duncan taraf $\alpha = 5\%$.

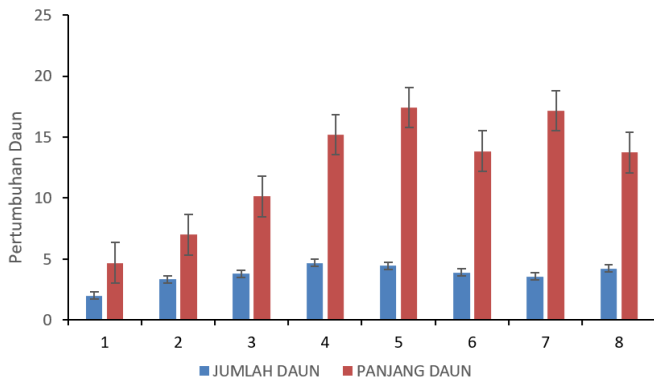
Pertumbuhan daun diamati pada akhir percobaan dengan parameter jumlah daun dan panjang daun. Awal percobaan adalah plantlet dari media multiplikasi yang dipindahkan ke media perakaran dengan pemberian beberapa konsentrasi chitosan.

Media yang diperkaya dengan chitosan memberikan pengaruh nyata dibandingkan dengan media tanpa chitosan. Pertumbuhan panjang daun terbesar nampak pada pemberian 15% chitosan yaitu 17,43 mm. Sedangkan penambahan chitosan dengan konsentrasi 20% atau lebih tidak memberikan pengaruh yang signifikan dengan chitosan 15%. Hal yang sama terlihat pada pertumbuhan jumlah daun yang menunjukkan pertumbuhan terbaik pada konsentrasi chitosan 10%. Kombinasi chitosan 10 mg/L dengan TDZ 0,1 mg/L memberikan pengaruh terbaik pada berat total PLB *Phalaenopsis gigantea* 20 minggu setelah kultivasi yaitu 4,8 gram (Samarfard *et al.*, 2014).

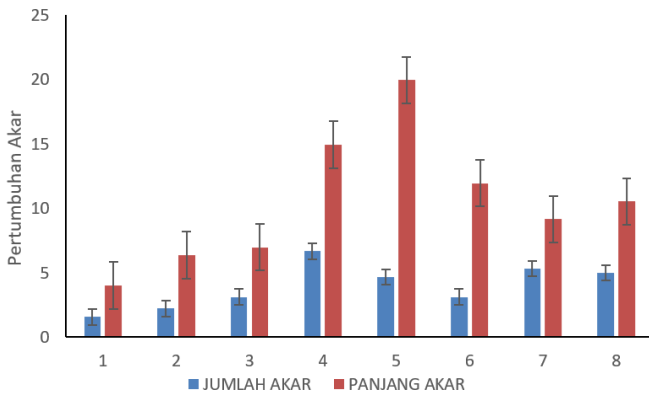
Pemberian chitosan sebanyak 15 ppm pada kultur PLB anggrek *Phalaenopsis* sp. memberikan pengaruh positif pada pertambahan jumlah, berat dan diameter PLB, sedangkan untuk pertumbuhan jumlah plantlet, jumlah daun, akar serta panjang akar tampak pada pemberian 5% chitosan (Dewanty, 2011).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah daun pada akhir pengamatan terbanyak pada media dengan penambahan chitosan 10% dan 15% yaitu 4,67 dan 4,44 helai. Peningkatan ini cukup signifikan dibanding dengan kontrol. Kombinasi Chitosan dengan ekstrak lotus dengan perbandingan 100 mg/L dan 5 mg/L yang diaplikasikan pada aklimatisasi plantlet anggrek silangan *Dendrobium* "surepeach" selama 10 minggu di dalam *greenhouse* yang dilakukan oleh Charoenwattana & Petprapai (2013) memberikan hasil terbaik yaitu 8,5 helai, dimana tanpa perlakuan jumlah daun 5,1 helai daun.

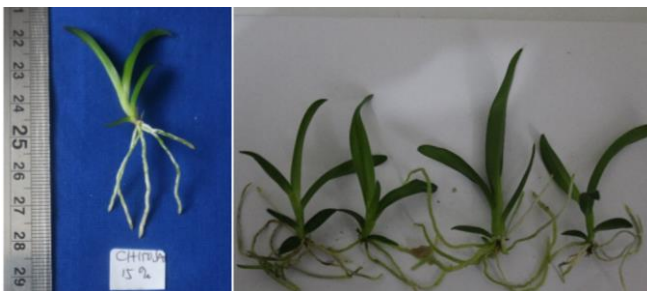
Gambar 2 memperlihatkan pengaruh chitosan pada pertumbuhan akar plantlet anggrek *D. lasianthera* J.J.Sm. baik jumlah maupun panjang akar. Chitosan dalam jumlah kecil dapat memberikan peningkatan yang signifikan. Manfaat lain dari chitosan adalah mampu



Gambar 1. Efek Chitosan pada rata-rata jumlah daun dan panjang daun plantlet anggrek *D. lasianthera* umur 4 bulan setelah kultivasi pada media VW tahap perakaran.



Gambar 2. Efek chitosan pada rata-rata jumlah akar dan panjang akar plantlet anggrek *D. lasianthera* umur 4 bulan setelah kultivasi pada media VW tahap perakaran.



Gambar 3. Plantlet *D. lasianthera* umur 4 bulan dalam media perakaran dengan 15% chitosan yang siap dipindahkan ke tahap aklimatisasi.

berperan sebagai anti bakteri yang sekaligus ramah lingkungan (Bangun *et al.*, 2018).

Pertumbuhan akar

Chitosan sebagai bahan organik yang sudah dikenal luas di bidang pertanian, ternyata mampu meningkatkan jumlah dan panjang akar plantlet *in vitro*. Konsentrasi Chitosan 15% berhasil meningkatkan pertumbuhan akar secara sangat signifikan yaitu 19,97 mm, lima kali dibandingkan tanpa chitosan (Tabel 2). Jumlah akar terbanyak terdapat pada perlakuan dengan penambahan 10% chitosan yaitu 6,67, meningkat 4 kali dibanding tanpa chitosan.

Aplikasi chitosan dengan kisaran konsentrasi 5-15 mg/L memberikan peningkatan signifikan pada regenerasi tunas eksplant *Grammatophyllum speciosum* dalam media padat (Sopalun *et al.*, 2010), sedangkan untuk anggrek *Dendrobium* "Eiskul" konsentrasi optimal adalah 10-20 mg/L (Pompianpakdee *et al.*, 2010). Sedangkan penyemprotan chitosan dengan konsentrasi 2,5-40 mg/L dapat meningkatkan panjang daun *Paphiopedilum* (Chandrkrachang, 2002).

Penambahan panjang akar cukup signifikan dengan penambahan chitosan sebanyak 15% yaitu 19,20 mm dimana tanpa chitosan akar hanya mencapai panjang 6,61 mm. Hal ini serupa dengan percobaan pada propagasi *Dendrobium hybrid* dari Thailand, pemberian oligomerik chitosan 10 - 20 mg/L mampu mamucu secara signifikan panjang tunas, dan jumlah daun (Pompianpakdee, *et.al.* 2010). Chitosan yang diaplikasikan pada tanaman hias mampu mempercepat pembungaan (Ohta *et al.*, 2004).

Pada tahap *in vitro* chitosan berpengaruh positif dimulai pada tahap pembentukan protocorm, sampai pertumbuhan tunas, dan akhirnya pada tahap perakaran. Selanjutnya efek positif tersebut terus berlangsung pada tahap aklimatisasi dengan dosis yang lebih kecil. Plantlet anggrek bulan pada umur 12 minggu masa aklimatisasi mengalami pertumbuhan yang signifikan pada jumlah, lebar dan panjang daun dengan penambahan 3 ppm chitosan pada pupuk pertumbuhan yang diaplikasikan pada media (Wulandari & Sukma, 2014). Sedangkan pada 0-8 minggu fase aklimatisasi *Phalaenopsis* pengaruh chitosan sudah terlihat signifikan. Pada penelitian ini *D. lasianthera* nampak pertumbuhan akar

terbaik terjadi pada penambahan 15 % chitosan yang mencapai 19,20 mm. Hal ini mengindikasikan bahwa chitosan sangat baik dalam memacu pertumbuhan akar yang dimulai dari tahap perakaran di dalam botol dan diteruskan sejak awal aklimatisasi hingga 8 minggu. Pada tahap selanjutnya yaitu pembungaan, penambahan chitosan 0,15 % dapat meningkatkan jumlah kuntum bunga per tandan, serta menambah waktu kesegaran anggrek dendrobium hibrida yang dibudidayakan dalam pot (Sukewijaya, 2013).

Chitosan sebanyak 7,5 ppm yang disemprotkan langsung pada daun anggrek *Dendrobium Sonia 17* menunjukkan peningkatan dalam jumlah dan kualitas produksi seperti jumlah dan panjang spike, diameter bunga menjadi lebih besar, serta meningkatkan jumlah bunga per tangkai (florete) (Komari *et al.*, 2017). Selanjutnya Kumari *et al.* (2017) juga melaporkan hasil penelitiannya bahwa penerapan teknologi yang sustainable dalam produksi bunga potong anggrek *Dendrobium Sonia 17*, chitosan menunjukkan efek positif dimana serangan penyakit dan gangguan hama berkurang sehingga dapat menekan biaya produksi, dan mempunyai sifat ramah lingkungan.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa chitosan memberikan pengaruh positif pada perkembangan dan pertumbuhan plantlet anggrek *D. lasianthera* J.J.Sm. Konsentrasi 15 % memberikan efek terbaik pada pertumbuhan akar, daun dan plantlet secara umum. Panjang daun mencapai hampir 4 kali panjang daun tanpa chitosan, sedangkan pertumbuhan panjang akar terbaik mencapai 5 kali panjang akar pada media control. Tingkat kematian plantlet selama percobaan tergolong kecil untuk semua konsentrasi chitosan yang diaplikasikan yaitu kurang dari 3 %. Chitosan bisa menjadi alternatif untuk digunakan sebagai pemacu pertumbuhan pada tanaman, selain murah, chitosan juga ramah lingkungan karena berasal dari kulit crustacean dan fungi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi, melalui Dana PNBP Universitas Cenderawasih tahun 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Bangun, H., S. Tandiono and A. Arianto. 2018. Preparation and evaluation of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles suspension as an antibacterial agent. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8(12): 147-156.
- Chandrkrachang, S. 2002. The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand *In*: K. Suchiva, S. Chundrakrachang, P. Methacanon, M.G. Peter (Eds). *Advances in Chitin Science*. 5: 458-462.
- Chibu, H., and H. Shibayama. 2001 Effects of chitosan applications on the growth of several crops, *In*: T. Urugami., K. Kurita, T. Fukamizo (Eds). *Chitin and chitosan, chitin and chitosan in life science*. Yamaguchi. pp. 235-239.
- Charoenwattana, P., and U. Petprapai. 2013. Effect of chitosan and lotus extracts as growth promoter in *Dendrobium* orchid. *International Journal of Environmental and Rural Development*. 4: 133-137.
- Devlieghere, F., A. Vermeulen, and J. Dehevere. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* 21(6): 703-714.
- Dewanty, R. 2011. Aplikasi penggunaan Chitosan terhadap pembentukan protocorm like body (PLB) pada anggrek *Phalaenopsis* sp.L. Skripsi. Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
- Hirano, S. 1997. Application of chitin and chitosan in the ecological and environment fields. *In*: FMA Goosen (Ed). *Application of chitin and chitosan*. Technomic Publishing Company. pp: 31-54.
- Kumari, S., J. Singh and F.G. Panj. 2017. Economic returns and enhanced quality in orchid (*Dendrobium Sonia 17*) using biosafe compound chitosan. *Agricultural Research & Technology*. 6(3): 0050-0054.
- Millar, A. 1978. *Orchids of Papua New Guinea*. Australian National University Press. Canberra, Australia.
- Noerdjito, M. dan I. Maryanto. 2001. Jenis-jenis hayati yang dilindungi Perundang-undangan Indonesia. *Puslitbang Biologi LIPI*. Hal.: 151-154.
- Pitoyo, A., M.R. Hani, and E. Anggarwulan. 2015. Application of chitosan spraying on acclimatization success of tiger orchid (*Grammatophyllum scriptum*) plantlets. *Nusantara Bioscience*. 7(2): 185-191.
- Pospieszny, H., S. Chirkov, and J. Atebekov. 1991. Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. *Plant Sci*. 79: 63-68.

- Pornpienpakdee, P.R. Singhasurasak, P. Chaiyasap, R. Pichyangkura, R. Bunjongrat, S. Chadchawan and P. Limpanavech. 2010. Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. *Scientia Horticulturae*. 124: 490-499.
- Samarfard, S., M.A. Kadir, S.B. Kadzimin, H.M. Saud, S.A. Ravanfar, and M. Danase. 2014. In vitro propagation and detection of somaclonal variation in *Phalaenopsis gigantea* as affected by chitosan and thidiazuron combinations. *Hort. Science*. 49(1): 1-7.
- Sivanesan, I. and S.W. Park. 2014. The role of silicon in plant tissue culture. *Frontiers in Plant Science*. 5(571): 1-4.
- Sukewijaya, I.M. 2013. Efikasi chitosan untuk memperpanjang flower longevity bunga anggrek *Dendrobium* hibrida dalam pot (potted flower). *Agrotrop*. 3(2): 85-91.
- Sukwattanasinitt, M., A. Klaiherd, K. Skulnee, and S. Aiba. 2001. Chitosan as a releasing device for 2,4D herbicide. In: T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Eds). Chitin and chitosan, chitin and chitosan in life science. Yamaguchi. pp. 142-143.
- Utami, E.S.W., S. Hariyanto, and Y.S.W. Manuhara. 2017. In vitro propagation of the endangered medicinal orchid *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm. through mature seed culture. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(5): 406-410.
- Wanichpongpan, P., K. Suriyachan, and S. Chandkrachang. 2001. Effects of chitosan on the growth of gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*), In: T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Eds). Chitin and chitosan, chitin and chitosan in life science. Yamaguchi. pp.: 198-201.
- Wiyatie, Muslimin, dan Dewi. 2018. Pertumbuhan protocorm like bodies anggrek *Coelogyne celebensis* J.J.Smith pada berbagai konsentrasi air kelapa secara in vitro. *Jurnal Warta Rimba* 6(3): 33-41.
- Wulandari, T dan D. Sukma. 2014. Karakterisasi morfologi dan pertumbuhan populasi plantlet anggrek *Phalaenopsis* hasil persilangan selama tahap aklimatisasi. *J. Hort. Indonesia*. 5(3): 137-147.