

Kultur spora in vitro tiga varian pakis simpei *Cibotium barometz*

In vitro spore culture of three variants of the golden chicken fern *Cibotium barometz*

YUPI ISNAINI, TITIEN NGATINEM PRAPTOSUWIRYO

Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl. Ir.H. Juanda 13 P.O.Box 309 Bogor 16003, Jawa Barat.
Tel./Fax. +62-251 8322187, *email: yupinurfauzi@yahoo.com.

Manuskrip diterima: 20 Februari 2015. Revisi disetujui: 8 Agustus 2015.

Isnaini Y, Praptosuwiryo TNg. 2015. Kultur spora in vitro tiga varian pakis simpei *Cibotium barometz*. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1649-1653*. Pakis simpei atau pakis emas, *Cibotium barometz* (L.) J. Sm., merupakan salah satu jenis komoditi ekspor Indonesia yang penting sebagai bahan obat tradisional maupun modern. Perdagangan jenis ini masih mengandalkan hasil dari alam, akibatnya keberadaannya di alam mulai terbatas. Oleh karena itu jenis ini dimasukkan dalam Appendix II CITES (Convention on International Trade in Endangered Species). Studi populasi dan morfologi *C. barometz* telah dilakukan di 5 provinsi di Sumatera. Hasil penelitian menemukan bahwa *C. barometz* terdiri dari 3 varian yang dapat dikenali berdasarkan warna bulunya, yaitu kuning emas, coklat dan bule. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan kecepatan pertumbuhan dan perkembangan gametofit tiga varian *C. barometz* dengan kultur spora in vitro. Spora dari enam genotipe yang tercakup dalam 3 varian *C. barometz* dikedambahkan melalui kultur spora in vitro secara bertahap. Spora disemai pada media Murashige & Skoog dengan modifikasi setengah konsentrasi ($\frac{1}{2}$ MS) dengan penambahan berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP (0, 2, 4 dan 6 mg/L) dan NAA (0; 0,01; 0,03 dan 0,05 mg/L). Subkultur untuk penjarangan spora yang berkecambah dilakukan pada media $\frac{1}{2}$ MS tanpa zat pengatur tumbuh dilanjutkan dengan induksi pembentukan sporofit menggunakan media MS, $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{4}$ MS dengan penambahan NAA (0; 0,5 dan 1 mg/L), dalam rancangan faktorial. Hasil pengamatan menunjukkan spora mulai berkecambah paling cepat 14 hari setelah semai. Untuk semua varian, jumlah rhizoid dan fase filamen paling banyak terdapat pada media semai $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan 2 mg/L BAP dengan atau tanpa penambahan 0,01 mg/L NAA. Dari dua varian yang dibandingkan (kuning emas dan coklat emas), sporofit paling banyak terbentuk pada media $\frac{1}{4}$ MS tanpa penambahan NAA. Jumlah tertinggi sporofit ditemukan pada satu genotipe dari *C. barometz*, yaitu varian coklat emas.

Kata kunci: *Cibotium barometz*, pakis emas, tumbuhan paku obat, kultur spora in vitro

Isnaini Y, Praptosuwiryo TNg. 2015. In vitro spore culture of three variants of the golden chicken fern *Cibotium barometz*. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1649-1653*. The golden chicken fern, *Cibotium barometz* (L.) J. Sm., is an important Indonesian export commodity for both traditional and modern medicine. This trade commodity still relies on harvest from the wild, therefore this species has been included in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). Morphological and population studies of *C. barometz* in Sumatra have been conducted in 5 provinces. The results showed that *C. barometz* of Sumatra consists of three variants which are mainly distinguished by hair color, namely 'golden yellow', 'golden brown', and 'pale or white'. The purpose of this study was to compare the rate of growth and development of the gametophytes of three variants of *C. barometz* in vitro culture. Six genotypes of the three variants were germinated via in vitro spore culture. Spores were sown on a $\frac{1}{2}$ Murashige & Skoog (1/2MS) media with the addition of BAP (0, 2, 4 dan 6 mg/L) and NAA (0; 0.01; 0.03 dan 0.05 mg/L). A $\frac{1}{2}$ MS without BAB and NAA was used for sub-culture. Sporophyte induction used MS, $\frac{1}{2}$ MS, and $\frac{1}{4}$ MS with the addition of NAA (0; 0.5 dan 1 mg/L), in a factorial arrangement. The first germination occurred 14 days after sowing. For all variants, the highest numbers of rhizoid and filamentous stages were observed on $\frac{1}{2}$ MS media with the addition of 2 mg/L BAP with or without the addition of 0.01 mg/L NAA. For two variants (golden yellow and golden brown) the highest number of sporophytes occurred on $\frac{1}{4}$ MS without NAA. The highest number of sporophyte formation occurred on one genotype of one variant, namely the 'golden brown'.

Keywords: *Cibotium barometz*, golden chicken fern, medicinal fern, spore culture in vitro

PENDAHULUAN

Cibotium barometz dikenal dengan nama pakis simpei, pakis mas, pakis monyet, *gou ji* (Cina), dan lain-lain. Jenis ini tersebar di Cina, India, western Malay Peninsula, Indonesia (Jawa dan Sumatra), Myanmar, Thailand, Viet Nam, Jepang (Zhang et al. 2008, Taiwan (van Steenis and Holtum 1982), Laos dan Philippines (Nguyen et al. 2009).

Cibotium barometz dilaporkan tumbuh di tanah yang asam (Zhang et al. 2008; Praptosuwiryo et al. 2011), di hutan primer dan sekunder di lereng-lereng bukit atau gunung pada ketinggian 600-800 m dpl (Holtum 1963; Praptosuwiryo et al. 2011) dan di area hutan terbuka pada ketinggian sampai 1600 m dpl. (Nguyen et al. 2009; Praptosuwiryo et al. 2011).

Cibotium barometz telah lama digunakan di Asia untuk bahan obat, makanan dan serat (Lemmens et al. 1989).

Rimpang dan akar tumbuhan ini dipanen untuk bahan obat, untuk mempercepat pembekuan darah, obat rematik, dan typus (Puri 1970; May 1978; Praptosuwiryo 2003; Nguyen et al. 2009). Bulu yang menyelimuti rimpang dan tangkai daun juga dimanfaatkan untuk isi bantal (Chandra 1970; van Steenis and Holtum 1982) atau sebagai bahan pengepakan (May 1978). Di sisi lain, Oldfield (1995) melaporkan pohon paku ini juga digunakan sebagai tanaman hias dalam pot dan untuk pengisi taman serta untuk media tumbuh anggrek.

Banyaknya manfaat *C. barometz* sebagai bahan obat memicu maraknya pencarian bulu atau rimpangnya di hutan untuk diperdagangkan. Pada tahun 2005-2007, tumbuhan ini di Indonesia, juga sempat marak diperdagangkan sebagai tanaman hias dalam pot. Bahkan sampai saat ini, beberapa pedagang tanaman hias masih menjual paku ini di Sumatra Barat. Walau demikian, tumbuhan paku ini masih berstatus sebagai tumbuhan liar, usaha-usaha budidaya belum dilakukan secara intensif. Sementara itu kebutuhan ekspor nasional *pili cibotii* (bulu *C. barometz*) di Indonesia juga masih mengandalkan hasil eksploitasi dari alam. Oleh karena itu sejak tahun 1976 jenis ini dimasukkan dalam Appendix II CITES sehingga pemanfaatannya ditentukan berdasarkan sistem kuota.

Saat ini populasi-populasi lokal *C. barometz*, termasuk di Sumatera, mengalami tekanan keterancaman disebabkan oleh maraknya pengalihan fungsi lahan dan eksploitasi yang berlebihan untuk perdagangan. Untuk mengantisipasi kepunahan jenis ini dan memenuhi keperluan bibit untuk keperluan domestikasi dan reintroduksi, diperlukan kajian budidayanya. Paku ini bisa diperbanyak secara vegetative dari rimpang atau secara generatif dari sporanya. Usaha perbanyak vegetatif dari rimpang dan perbanyak konvensional dengan semai spora pada media alami telah dilakukan di Kebun Raya Bogor sejak tahun 2011 (Praptosuwiryo et al., data tidak dipublikasi), tetapi jumlah bibit siap pindah semai (*hardening*) yang dihasilkan masih jauh dari yang diharapkan dan membutuhkan waktu cukup lama (lebih dari 12 bulan). Perbanyak *C. barometz* dengan teknik kultur spora in vitro diharapkan menjadi alternative metode perbanyak untuk menghasilkan bibit secara massal dalam waktu singkat.

Cibotium barometz memperlihatkan variasi morfologi. Studi perbandingan morfologi dari populasi jenis ini dari 91 koleksi yang dikumpulkan dari 16 lokasi di Lima Puluh Kota, Sumatera Barat, memperlihatkan bahwa jenis ini dikenali mempunyai tiga varian, yaitu varian kuning emas, coklat emas dan putih kecoklatan atau bule. Tiga varian tersebut dapat dikenali berdasarkan kombinasi ciri-ciri: warna bulu, keberadaan bulu pada tangkai daun (stipe) dan tulang tengah anak daun (costae), torehan lembaran daun, jarak segmen, percabangan urat-urat daun dan jumlah sori (Rugayah et al. 2009). Terkait dengan seleksi varian untuk budidaya maka pertanyaan yang perlu dijawab adalah 'apakah tiga varian tersebut memiliki perbedaan dalam segi pertumbuhan dan perkembangan'. Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk membandingkan kecepatan pertumbuhan dan perkembangan dari tiga varian *C. barometz* (kuning emas, coklat emas dan putih-kecoklatan atau bule). Hasil yang diperoleh diharapkan dapat memberi

informasi dan acuan untuk usaha percepatan budidaya, pengelolaan dan penyelamatan *C. barometz*.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa spora dari 3 varian *C. barometz* yang berasal dari berbagai lokasi (Tabel 1).

Cara kerja

Persiapan media semai

Media semai yang digunakan adalah media dasar Murashige dan Scoog (MS) dengan konsentrasi hara makro, mikro dan vitamin masing-masing 50% ($\frac{1}{2}$ MS), gula 20 g/L dan agar gelrite 2 g/L. Keasaman media diatur pada pH 5.7 ± 0.01 . Media semai yang telah disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dituangkan ke dalam cawan Petri yang sebelumnya juga telah disterilisasi dengan autoklaf dan dikeringkan dalam oven dengan suhu sekitar 70°C sebelum digunakan.

Sterilisasi dan penyemaian spora

Bahan sterilan yang digunakan adalah klorok komersial dengan berbagai konsentrasi dan *tween* 80. Metode sterilisasi yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 2 metode yang berbeda. Metode pertama (Metode A) untuk spora Cb, Cb1, Cb2 dan Cb3 dilakukan dengan cara sebagai berikut: Spora yang telah dibersihkan selanjutnya disterilisasi menggunakan clorok komersial dengan konsentrasi 20%, 10% dan 5% dengan penambahan *tween* 80. Sterilisasi dilakukan dengan perendaman ke dalam larutan klorok 20% selama 10 menit lalu spora dibiarkan mengendap dan cairan sterilannya dibuang perlahan dengan bantuan pipet. Selanjutnya perendaman dalam klorok 10% dan 5% masing-masing selama 10 dan 5 menit, lalu spora dibilas menggunakan akuades steril beberapa kali sampai tidak tercium aroma clorok. Akuades dari bilasan terakhir digunakan sebagai perantara spora ke media semai.

Tabel 1. Bahan tanam yang digunakan untuk perbanyak *C. barometz* secara in vitro

Kode spora	Asal koleksi	Lokasi tanaman	Kode koleksi	Varian	Panen spora
Cb	Jambi	KR Bogor	TNgP2509	Kuning emas	2012
Cb-1	Sumbar	Ecopark, Cibinong Science Center	TNgP 3353	Kuning emas	2013
Cb-2	Sumbar	KR Cibodas	TNgP 2780	Coklat	2013
Cb-3	Sumbar	KR Ciobdas	TNgP 2792	Kuning emas	2013
Cb-4	Sumbar	KR Cibodas	TNgP 2844	Coklat	2013
Cb-5	Sumbar	Hutan masyarakat, Bukit Sikik	TNgP s.019	Bule	2013

Metode sterilisasi kedua (Metode B) untuk spora Cb4 dan Cb5 dilakukan dengan cara yang lebih singkat. Spora dimasukkan ke dalam *effendorf* 1 mL ditambah klorok komersial konsentrasi 20% dan dibiarkan selama 5 menit, lalu spora diendapkan dengan bantuan alat sentrifus mikro. Selanjutnya cairan strilan dibuang dan diganti dengan klorok dengan konsentrasi 10%, dibiarkan selama 5 menit, lalu diendapkan kembali dengan cara yang sama. Selanjutnya cairan sterilan dibuang dan spora langsung dibilas dengan akuades steril dengan cara menambahkan akuades, mengocok dan mengendapkan spora dengan cara yang sama lalu akuadesnya dibuang. Pembilasan dilakukan setidaknya 3 kali atau sampai tidak tercium bau klorok. Akuades bilasan terakhir digunakan untuk semai spora.

Penyemaian spora dilakukan dengan cara mengambil spora beserta akuades yang sengaja ditambahkan setelah pembilasan spora pasca sterilisasi. Pengambilan spora dilakukan dengan bantuan pipet steril, lalu disemprotkan ke media semai di cawan Petri. Spora yang telah disemai bersama akuades steril selanjutnya diratakan dengan cara menggoyang cawan Petri secara perlahan agar spora tersebar dengan baik dan tidak menumpuk.

Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat ada tidaknya kontaminasi dan mengetahui waktu spora mulai berkecambah. Jumlah spora yang berkecambah dihitung di bawah mikroskop dibandingkan dengan jumlah spora yang berada pada bidang pandang mikroskop untuk mendapatkan persentase spora berkecambah. Spora yang berkecambah selanjutnya disubkultur ke media dasar ½ MS tanpa penambahan hormone di dalam botol kultur untuk pejarangan.

Subkultur untuk pembesaran dan pembentukan sporofit

Kumpulan tanaman kecil yang masih bergerombol (protalus) hasil penjarangan dari spora yang berkecambah dari Cb1 (mewakili varian kuning emas) dan Cb2 (mewakili varian coklat) selanjutnya disubkultur ke media perlakuan MS, ½ MS dan ¼ MS dengan penambahan gula 30 g/L dan zat pengatur tumbuh NAA dengan konsentrasi 0; 0,5 dan 1 mg/L. Penelitian pembesaran ini dilakukan untuk kultur Cb-1 dan Cb-2. Setiap perlakuan diulang 10 kali (10 botol) dan setiap botol berisi 3 massa protalus. Pengamatan dilakukan untuk melihat berapa banyak sporofit yang terbentuk di setiap media perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

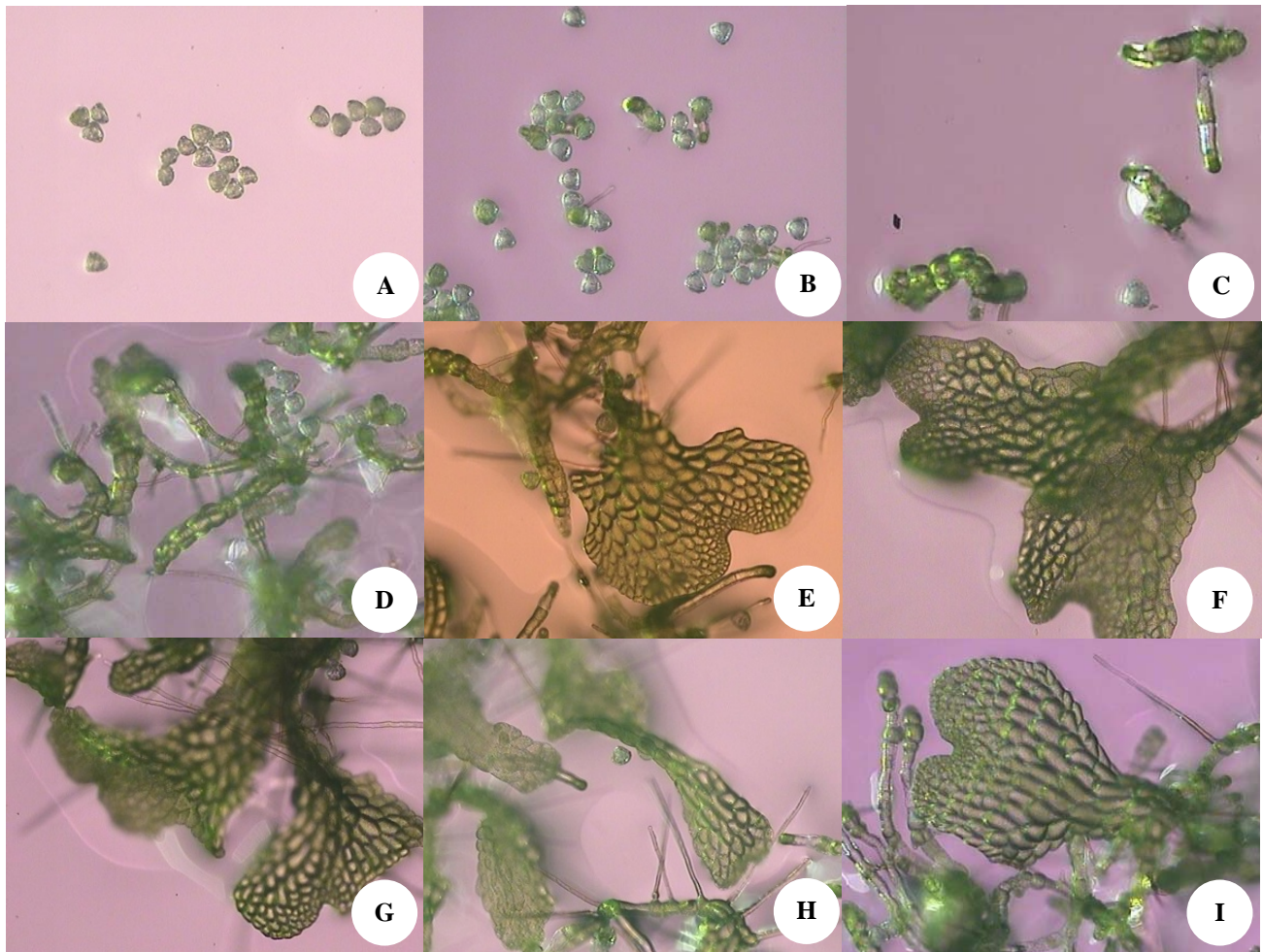
Hasil percobaan sterilisasi spora menunjukkan bahwa kedua metode yang dicoba memberikan hasil yang baik, yang ditandai dengan persentase kontaminasi yang relatif rendah, kecuali untuk spora Cb yang mencapai 62,5% (Tabel 2). Metode sterilisasi spora ini mudah dilakukan dan hanya menggunakan satu macam sterilan yang murah dan mudah diperoleh. Hasil pengamatan selanjutnya menunjukkan spora mulai berkecambah paling cepat 14 hari setelah semai untuk *C. barometz* varian kuning emas dan paling lambat 49 hari setelah semai untuk *C. barometz* varian bule (Tabel 2). Spora yang berkecambah untuk *C. barometz* varian kuning emas dan coklat selanjutnya berkembang membentuk spatula, hati dan seterusnya, sedangkan varian bule selanjutnya mati, sehingga tidak dilanjutkan ke tahap subkultur dan seterusnya.

Hasil penelitian Khan et al. (2008) pada kultur in vitro spora *Asplenium nidus* menunjukkan bahwa kloroks komersial 20% dengan penambahan 2 tetes tween, efektif untuk sterilisasi spora. Jika konsentrasinya di bawah 20% spora tidak steril sedangkan di atas 20% tingkat mortalitas tinggi karena adanya peningkatan permeabilitas sodium hipoklorit di dalam sel spora. Sementara itu, penelitian Li et al. (2010) menunjukkan bahwa spora aseptis *Cibotium barometz* dapat dihasilkan setelah disterilisasi dengan sodium hipoklorit 2% selama 10 sampai 12 menit. Menurut Banks (1999), konsentrasi dan lama paparan zat sterilan sangat bervariasi tergantung pada tipe bahan tanaman. Penambahan tween memastikan kontak antara sterilan dengan eksplan dapat menyeluruh dengan mengurangi tegangan permukaan dan menghilangkan gelembung udara. Pada penelitian ini, metode sterilisasi A menggunakan tambahan tween 80 pada sterilannya, sedangkan pada metode sterilisasi B tidak digunakan.

Hasil pengamatan selanjutnya menunjukkan bahwa spora mulai berkecambah membentuk rhizoid, filament atau keduanya paling cepat 14 hari setelah semai (14 HSS). Selanjutnya, spora yang berkecambah mulai membentuk spatula 33 hari setelah semai dan mulai membentuk hati pada 61 hari setelah semai (Gambar 1).

Tabel 2. Jumlah kultur spora yang kontaminasi setelah disterilisasi dengan metode A dan B, waktu spora mulai berkecambah dan persentase kecambah

Kode spora	Varian	Metode sterilisasi	Jumlah kultur kontaminasi (%)	Waktu spora mulai berkecambah (hss)	Jumlah spora yang mulai berkecambah (%)
Cb	Kuning emas	A	62,5	14	-
Cb-1	Kuning emas	A	4,2	15	7,9
Cb-2	Coklat	A	4,4	19	-
Cb-3	Kuning emas	A	26,7	19	-
Cb-4	Coklat	B	5	29	5,1
Cb-5	Bule	B	0	49	4,6



Gambar 1. Fase pertumbuhan dan perkembangan kultur in vitro *Cibotium barometz* pada media $\frac{1}{2}$ MS. HSS = hari setelah semai. A. 9 HSS; B. 14 HSS; C. 25 HSS; 32 HSS; E. 39 HSS; F. 45 HSS; G. 51 HSS; 57 HSS; I. 63 HSS; J. 70 HSS.

Tabel 3. Jumlah sporofit serta bentuk hati dari kultur Cb-1 dan Cb-2 yang terbentuk di media pembesaran 6 bulan setelah subkultur

Media	Sporofit		Hati normal		Hati abnormal	
	Cb-1	Cb-2	Cb-1	Cb-2	Cb-1	Cb-2
MS	0.1	0.1	0.1	0.4	2.1	34.8
MS+0,5 mg/L NAA	0	0	0.6	0.8	3.1	32.8
MS+1mg/L NAA	0.1	0.1	6.7	0.2	15.2	31.9
12MS	2.3	0	2.4	0.2	14.5	37.1
1/2MS+0,5 mg/L NAA	0.2	0.4	4.7	0.9	17	31.9
1/2MS+1mg/L NAA	0.7	0.8	2.4	1	17.3	40
1/4MS	1.9	14.5	1.7	1.2	18.2	36.8
1/4MS+0,5 mg/L NAA	1.1	6.8	1.7	3.5	17.8	35.5
1/4MS+1mg/L NAA	0.7	3.5	2.6	2.1	7.6	27.7

Spora yang telah berkecambah dan membentuk struktur rhizoid (struktur seperti akar), filament (seperti calon daun), spatula dan atau hati selanjutnya disubkultur ke media $\frac{1}{2}$ MS tanpa zat pengatur tumbuh untuk penjarangan dan pembesaran. Tetapi pada pengamatan selanjutnya terlihat kultur mengalami multiplikasi yang sangat banyak dan sulit dikendalikan sehingga tanaman tumbuh berge-

rombol dan sulit untuk mengalami pembesaran sampai membentuk sporofit. Untuk menginduksi pembentukan sporofit, Kultur Cb1 (varian kuning emas) dan Cb2 (varian coklat) yang masih bergerombol disubkultur ke media pembesaran yang terdiri dari media MS, $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{4}$ MS dengan penambahan 0; 0,5 dan 1 mg/L NAA.

Hasil pengamatan 6 bulan setelah subkultur menunjukkan sporofit paling banyak terbentuk di media $\frac{1}{4}$ MS tanpa penambahan NAA untuk kultur Cb-2 dan di media $\frac{1}{2}$ MS untuk kultur Cb-1. Jumlah sporofit yang terbentuk pada Cb2 (varian coklat) jauh lebih banyak dan berbeda secara signifikan dengan jumlah spora yang terbentuk pada Cb1 (varian kuning emas). Jumlah sporofit yang terbentuk masih sangat terbatas dan struktur lainnya yang dominan adalah bentuk hati abnormal (Tabel 3).

Menurut referensi yang ada, media $\frac{1}{2}$ MS banyak digunakan sebagai media penyemaian spora pada berbagai kultur in vitro paku-pakuan, seperti *Asplenium nidus* (Khan et al. 2008) dan *Cibotium barometz* (Li et al. 2010). Hasil penelitian Li et al. (2010) menunjukkan bahwa media kultur terbaik untuk induksi pembentukan sporofit adalah media $\frac{1}{10}$ MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh, tetapi media terbaik untuk perbanyak sporofit adalah

media ¼ MS dengan penambahan kinetin 2 mg/L dan NAA 0.1 mg/L. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pembentukan sporofit Cb-2 tertinggi terdapat pada media ¼ MS, namun tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Hasil penelitian Khoo dan Thomas (1980) menyebutkan bahwa pembentukan sporofit *Adiantum raddianum* terhambat pada media dengan konsentrasi mineral yang tinggi Di lain pihak, Cox et al. (2003) menunjukkan pertumbuhan terbaik untuk spora paku *Schizaea dichotoma* adalah pada media kultur yang konsentrasi mineralnya minim. Berdasarkan hasil pengamatan pada penelitian ini, pertumbuhan kultur spora *C. barometz* ini masih relatif lambat untuk membentuk tanaman lengkap (sporofit) di media kultur, sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menghasilkan sporofit yang lebih banyak dalam waktu relative singkat.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sementara bahwa kecepatan tumbuh varian coklat lebih cepat dibandingkan dengan varian kuning emas, sedangkan varian bule mengalami kematian pada tahap awal perkecambahan sehingga belum dapat dibandingkan dengan kedua varian lainnya. Pembentukan sporofit untuk kedua varian paling banyak pada media yang miskin nutrisi tetapi jumlahnya masih belum sesuai harapan untuk menghasilkan bibit yang banyak, sehingga masih diperlukan kajian lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Kegiatan Kompetitif LIPI 2013-2014 yang berjudul "Valuasi Varian Pakis Simpei (*Cibotium barometz*) sebagai Tumbuhan Penghasil Bahan Obat". Terima kasih disampaikan kepada kepada staf Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Raya Bogor-LIPI dan mahasiswa magang dari Universitas Gadjah Mada di Jogjakarta, Politeknik Negeri Lampung di Lampung, University Negeri Lampung di Lampung dan

Institut Pertanian Bogor di Darmaga, Bogor, yang telah membantu pelaksanaan kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Banks JA. 1999. Gametophyte development in Ferns. *Annual Rev. Plant Physiology* 50: 163-86.
- Chandra S. 1970. Vascular organization of the rhizome of *Cibotium barometz*. *Amer Fern J* 60 (2): 68-72.
- Cox J, Bhatia P, Ashwath N. 2003. In vitro spore germination of the fern *Schizaea dichotoma*. *Scientia Horticulturae* 97: 369-378.
- Holttum RE. 1963. Cyatheaceae. *Flora Malesiana Ser. II. Vol. 1* (2): 165.
- Khan S, Raziq M dan Kayani H.A. 2008. In vitro propagation of bird's nest fern (*Asplenium nidus*) from spore. *Pak J Bot* 40 (1): 91-97.
- Khoo SI, Thomas MB. 1980. Studies on the germination of fern spores. *Plant Propag* 26: 11-15.
- Lemmens RHMJ, Jansen PCM, Siemonsma JS, Stavast FM. 1989. Plant resources of South-East Asia. Basic list of species and commodity grouping. PROSEA Project, Wageningen, the Netherlands.
- Li X, Ye Q-M, Zhan QC, Kang B-L, Jian L-G, Huang M-L. 2010. In vitro culture and plant regeneration of *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. *Northern Horticulture* 2010 (6): 152-155.
- Nguyen T. 2006. The red list of medicinal plants of Viet Nam-2006. *J Med Mater* 11 (3): 97-105. [Vietnamese]
- Nguyen T, Le TS, Ngo DP, Nguyen QN, Pham TH, Nguyen TH. 2009. Non-detriment finding for *Cibotium barometz* in Viet Nam. SC58 Doc. 21.1. Annex 2.
- May LW. 1978. The economic uses and associated folklore of ferns and fern allies. *Bot Rev* 44 (4): 491-528.
- Oldfield S. 1995. Significant trade in CITES Appendix II plants. Tree ferns. Prepared for the CITES Secretariat by the World Conservation Monitoring Centre, Cambridge, UK.
- Praptosuwiryo TNg, Pribadi DO, Puspitaningtyas DM, Hartini S. 2011. Inventorying of the tree fern genus *Cibotium* of Sumatra: Ecology, population size and distribution in North Sumatra. *Biodiversitas* 12 (4): 204-211.
- Puri HS. 1970. Indian Pteridophytes used in folk remedies. *Amer Fern J* 60 (4): 137-143.
- Rugayah, Praptosuwiryo TNg, Puspitaningtyas DM. 2009. Morphological Variation of *Cibotium barometz* from West Sumatra. *Proceedings on The International Conference on Biological Science. Faculty of Biology, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia. 16-17 October 2009.*
- Zhang X-C, Jia J-S, Zhang G-M. 2008. Non-detriment finding for *Cibotium barometz* in China. *NDF Workshop Case Studies. WG 2-perennials.*