

Pengaruh Sumber dan Konsentrasi Nitrogen terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara *In Vitro*

Luluk Mukaromah¹, Tutik Nurhidayati¹, dan Siti Nurfadilah²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111

²UPT BKT Kebun Raya Purwodadi – LIPI

Jl. Surabaya-Malang, Km. 65 Purwodadi, Pasuruan 67163

E-mail: tutik@bio.its.ac.id

Abstrak—Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh sumber dan konsentrasi nitrogen, serta interaksi antara keduanya terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji *Dendrobium laxiflorum*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama, sumber nitrogen (ammonium, nitrat, dan kombinasi ammonium-nitrat). Faktor kedua, konsentrasi sumber nitrogen, 0 mg/l; 63,75 mg/l; 127,50 mg/l; 255,00 mg/l; 382,50 mg/l; 510,00 mg/l. Pengamatan dilakukan 90 HSI (hari setelah inokulasi). Persentase total pertumbuhan dan perkembangan biji *D. laxiflorum* 3,5% - 31,1%. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa sumber, dan konsentrasi nitrogen, serta interaksi antara kedua faktor tersebut berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji *D. laxiflorum* yang dikultur secara *in vitro*. Interaksi antara sumber nitrogen dan konsentrasi nitrogen ini mengindikasikan bahwa pengaruh sumber nitrogen spesifik pada berbagai level konsentrasi nitrogen. Perlakuan kombinasi sumber nitrogen (ammonium nitrat) dengan konsentrasi terendah 63,75 mg/l menghasilkan total persentase pertumbuhan dan perkembangan tertinggi dibandingkan perlakuan ammonium dan nitrat secara tunggal.

Kata Kunci—ammonium, *Dendrobium laxiflorum*, nitrat, pertumbuhan dan Perkembangan, sumber nitrogen, konsentrasi nitrogen.

I. PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman spesies anggrek yang cukup besar, di perkirakan hampir 5000 spesies anggrek tersebar di hutan-hutan Indonesia [1]. Anggrek-anggrek tersebut terancam kelestarian dan keberadaannya di alam akibat adanya eksploitasi anggrek secara besar-besaran, penebangan hutan secara liar, dan konversi hutan yang merupakan habitat asli anggrek. Salah satu jenis anggrek alam yang terancam adalah *Dendrobium laxiflorum*. Anggrek ini masuk dalam daftar spesies langka yang terancam kepunahan, dan mendapat prioritas konservasi, berdasarkan tingkat keterancamannya di alam [2]. *D. laxiflorum* juga masuk dalam daftar CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*) Appendiks 2. Upaya konservasi anggrek yang dapat dilakukan adalah dengan

perbanyak melalui kultur biji secara *in vitro*. Biji anggrek sangat kecil yang memerlukan suplai nutrisi dari luar untuk bisa tumbuh dan berkembang [3]. Di alam biji anggrek bersimbiosis dengan jamur mikoriza untuk memperoleh nutrisi yang dibutuhkan agar dapat berkecambah [4].

Fase pertumbuhan dan perkembangan biji anggrek melalui beberapa fase yaitu fase 0, dimana biji belum mengalami perkecambahan. Fase 1, terbentuk *protocorm*. Fase 2, *protocorm* dengan primordium daun. Fase 3, munculnya daun pertama. Fase 4, munculnya daun kedua diikuti tumbuhnya akar. Fase 5, pemanjangan daun dan perkembangan selanjutnya membentuk planlet [5].

Media yang digunakan dalam kultur *in vitro* harus berisi semua zat yang diperlukan untuk pertumbuhan biji anggrek baik makronutrien, mikronutrien, gula, dan vitamin [6]. Nitrogen dibutuhkan oleh tanaman sebagai komponen utama dari asam amino, dan protein yang berperan penting pada proses pertumbuhan. Sumber nitrogen yang dapat diserap harus berada dalam bentuk nitrat (NO_3^-) dan ammonium (NH_4^+) [7]. Dalam kultur *in vitro* penambahan nitrogen biasa diberikan dalam bentuk ion nitrat (NO_3^-) atau ammonium (NH_4^+) yang berikatan dengan senyawa lain baik dengan kalsium, dengan bentuk $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, dan dengan sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) [8]. Penambahan nitrogen dalam bentuk ammonium dapat mempercepat proses perkecambahan *Cattleya labiata* sedangkan nitrogen sumber nitrat justru menghambat perkecambahannya [9]. Perbandingan konsentrasi ammonium dan nitrat 3:2, menunjukkan hasil pertumbuhan vegetatif paling baik serta sistem perakaran yang kuat pada spesies *Catasetum fimbriatum* [10]. Peningkatnya konsentrasi ammonium pada media perkecambahan *Dactylorhiza incarnata* menyebabkan penurunan pembentukan *protocorm* dibandingkan dengan meningkatnya konsentrasi nitrat [11]. Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh sumber dan konsentrasi nitrogen (ammonium dan nitrat) yang efektif untuk proses pertumbuhan dan perkembangan dari spesies *D. laxiflorum*.

II. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2012, di Laboratorium Kultur Jaringan UPT BKT Kebun Raya Purwodadi LIPI. Jalan Surabaya-Malang, Km. 65 Purwodadi, Pasuruan Jawa Timur.

B. Bahan

Biji *Dendrobium laxiflorum* koleksi UPT BKT Kebun Raya Purwodadi-LIPI. Media Knudson C. padat yang telah di modifikasi. Nitrogen yang digunakan yaitu sumber ammonium dari senyawa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan nitrat dari senyawa $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, alkohol 70%, clorox 20%.

C. Sterilisasi biji dan Inokulasi

Biji anggrek *D. laxiflorum*. dimasukkan ke dalam kertas saring yang telah dilipat menjadi 9 bagian kemudian kertas saring distaples [12]. Sterilisasi kimia dilakukan dengan merendam biji anggrek tersebut ke dalam larutan Clorox 20% [13], dikocok pelan selama 30 menit, dan dibilas menggunakan aquades steril dengan 3 kali pengulangan. Inokulasi biji anggrek pada media dengan menggunakan jarum Ose steril sebanyak satu Ose dan ditaburkan dalam media. Selanjutnya cawan Petri ditutup rapat dan diberi Parafilm, dan diletakan di rak inkubasi hingga 3 bulan [14].

D. Rancangan Penelitian

Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan 2 faktor (Tabel 1). Faktor pertama yaitu sumber nitrogen yaitu ammonium (N_1), nitrat (N_2), dan kombinasi ammonium nitrat (N_3). Faktor kedua yaitu konsentrasi sumber nitrogen, yaitu 0 mg/l (K_0); 63,75 mg/l (K_1); 127,50 mg/l (K_2); 255,00 mg/l (K_3); 382,50 mg/l (K_4); 510,00 mg/l (K_5). Pemilihan konsentrasi ini didasarkan pada moralitas unsur N yang ada pada media dasar Knudson C.

E. Pengambilan Data dan Analisa Statistika

Pengambilan data pada pertumbuhan dan perkembangan dari eksplan biji *D. laxiflorum* dilakukan 3 bulan setelah inokulasi (90 hari setelah inokulasi biji) dengan mengamati fase 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 selanjutnya akan dihitung dengan menggunakan rumus persentase pertumbuhan biji [15].

% pertumbuhan Biji = $\frac{\text{Jumlah biji pada fase tertentu}}{\text{Jumlah total biji yang ditabur}} \times 100\%$

Selanjutnya seluruh data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANOVA tingkat kesalahan 5%. Jika ada pengaruh maka dilanjutkan dengan uji Tukey.

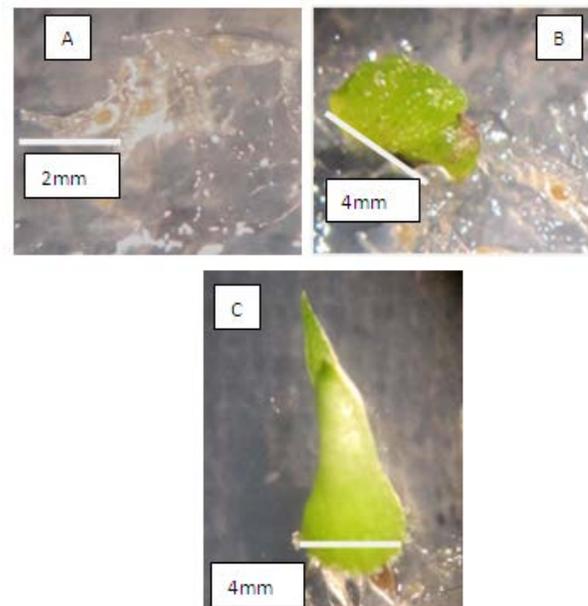
III. HASIL DAN DISKUSI

Pertumbuhan dan perkembangan pada tanaman merupakan proses pertambahan ukuran yang meliputi volume, bobot, jumlah sel, dan disertai dengan diferensiasi sel yang selanjutnya akan membentuk organ tanaman. Pada penelitian ini, biji anggrek *Dendrobium laxiflorum* mengalami partum-

Table 1.
Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial

Konsentrasi total N (mg/l) (K)	Sumber Nitrogen(N)		
	N_1	N_2	N_3
K_0	K_0N_1	K_0N_2	K_0N_3
K_1	K_1N_1	K_1N_2	K_1N_3
K_2	K_2N_1	K_2N_2	K_2N_3
K_3	K_3N_1	K_3N_2	K_3N_3
K_4	K_4N_1	K_4N_2	K_4N_3
K_5	K_5N_1	K_5N_2	K_5N_3

Gambar 1. Fase pertumbuhan dan perkembangan biji *Dendrobium laxiflorum*. Pengamatan menggunakan mikroskop stereo dengan perbesaran 20X. (A) Fase



0, biji belum mengalami perkecambahan (B) Fase 1; terbentuk *protocorm* yaitu bulatan-bulatan berwarna hijau. (C) Fase 2; *protocorm* diikuti dengan terbentuknya primordium daun (calon daun). (dokumentasi pribadi, 2012).

buhan ini biji anggrek *D. laxiflorum* yang diinokulasi pada media Knudson C, selama 3 bulan (90 Hari Setelah Inokulasi) mengalami proses pertumbuhan dan perkembangan. Proses ini diawali dengan biji anggrek *D. laxiflorum* yang masih lengkap dengan pelindung biji, 1 bulan setelah inokulasi biji mengalami pembesaran, sehingga pelindung biji pecah, dan terlihat membentuk bulatan-bulatan seperti gelembung berwarna hijau kekuningan yang disebut *protocorm* (fase 1). Selanjutnya setelah mencapai 3 bulan, *protocorm* tersebut berkembang membentuk primordium daun (calon daun) (fase 2). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada waktu 3 bulan (90 hari setelah inokulasi), biji anggrek *D. laxiflorum* dalam kultur *in vitro* yang diberi perlakuan sumber nitrogen yang berbeda (nitrat, ammonium, dan kombinasi nitrat dan ammonium), dan 5 konsentrasi nitrogen yang berbeda (0 mg/l; mg/l; 127,50 mg/l; 255,00 mg/l; 382,50 mg/l; 510,00 mg/l) mengalami pertumbuhan dan perkembangan seperti yang terli hat pada gambar 1. Kul-

Tabel 2.

Rata-rata persentase respon pertumbuhan dan perkembangan biji *Dendrobium laxiflorum* setelah 3 bulan inokulasi

Sumber N	Konsentrasi	Fase pertumbuhan dan perkembangan anggrek alam <i>D. laxiflorum</i>		
		Fase 1 (%)	Fase 2 (%)	Total (%)
N1	K0N1	0,0 ($\pm 0,00$) b	0,0 ($\pm 0,00$) d	0,0 f
	K1N1	3,5 ($\pm 1,08$)ab	0,0 ($\pm 0,00$) d	3,5 def
	K2N1	0,6 ($\pm 0,77$) b	0,0 ($\pm 0,00$) d	0,6 ef
	K3N1	0,6 ($\pm 0,77$) b	0,0 ($\pm 0,00$) d	0,6 ef
	K4N1	0,8 ($\pm 0,94$) b	0,0 ($\pm 0,00$) d	0,8 ef
N2	K5N1	0,0 ($\pm 0,00$) b	0,0 ($\pm 0,00$) d	0,0 f
	K0N2	0,0 ($\pm 0,00$) b	0,0 ($\pm 0,00$) b	0,0 f
	K1N2	4,8 ($\pm 1,46$)ab	1,5 ($\pm 0,95$)cd	6,4 def
	K2N2	3,8 ($\pm 1,85$)ab	0,8 ($\pm 0,92$) cd	4,6 def
	K3N2	2,1 ($\pm 1,31$) b	0,0 ($\pm 0,00$) d	2,1 def
N3	K4N2	4,8 ($\pm 1,60$)ab	1,0 ($\pm 1,18$)cd	5,8 def
	K5N2	12,3 ($\pm 2,98$)ab	3,9 ($\pm 1,94$) bcd	16,2 bcd
	K0N3	0,0 ($\pm 0,00$) b	0,0 (± 0) b	0,0 f
	K1N3	16,1 ($\pm 7,54$) a	15,0 ($\pm 5,84$) a	31,1 a
	K2N3	10,6 ($\pm 4,57$)ab	11,1 ($\pm 2,20$) ab	21,7 abc
	K3N3	8,4 ($\pm 6,71$)ab	6,2 ($\pm 1,57$) bcd	14,7 bcde
	K4N3	17,0 ($\pm 5,71$) a	8,0 ($\pm 1,98$) abc	25,0 ab
K5N3	6,2 ($\pm 1,45$)ab	2,5 ($\pm 0,85$) cd	8,7 cdef	

Keterangan: N1= ammonium, N2 = nitrat N3 = kombinasi ammonium nitrat. K0 = 0 mg/l, K1= 63,75 mg/l, K2=127,50 mg/l, K3=255,00 mg/l, K4= 382,50 mg/l, K5= 510,00 mg/l.

tur biji secara *in vitro* di pengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah ketersediaan unsur makronutrien dan mikronutrien. Unsur makronutrien essensial yang memiliki peran penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman adalah unsur N (nitrogen). Pada penelitian ini, rata-rata total persentase pertumbuhan dan perkembangan biji *D. laxiflorum* dari seluruh perlakuan yang telah dilakukan berkisar antara 3,5% - 31,1% (Tabel).

Berdasarkan hasil uji statistika ANOVA (Analisis Of Variance) dari seluruh data yang diperoleh pada penelitian ini (tabel 2) menunjukkan bahwa sumber nitrogen (ammonium, nitrat, dan kombinasi ammonium nitrat), konsentrasi nitrogen (0 mg/l; 63,75 mg/l; 127,50 mg/l; 255,00 mg/l; 382,50 mg/l; 510,00 mg/l) dan interaksi antara sumber dan konsentrasi nitrogen berpengaruh spesifik dan memberikan respon pertumbuhan dan perkembangan yang berbeda-beda terhadap biji anggrek *D. laxiflorum* secara *in vitro* ($P \leq 0,05$). Perlakuan nitrat secara tunggal menunjukkan persentase total pertumbuhan dan perkembangan tertinggi 16,2% pada konsentrasi tertinggi 510,00 mg/l. Sedangkan untuk perlakuan ammonium secara tunggal respon pertumbuhan dan perkembangan tertinggi 3,5% pada konsentrasi terendah 63,75 mg/l dan terus menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ammonium, dimana pada konsentrasi tertinggi 510,00 mg/l total persentase pertumbuhan dan perkembangan biji 0%. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman lebih tahan terhadap ketersediaan nitrat konsentrasi tinggi dalam biji dibandingkan dengan unsur ammonium, karena unsur nitrat masih dapat di translokasikan ke jaringan lain yang selanjutnya akan direduksi menjadi ammonium dan dapat

langsung disintesis menjadi asam amino [16], sedangkan akumulasi ammonium dalam kadar tinggi dalam biji dan melebihi jumlah yang diperlukan untuk metabolisme biji dimungkinkan dapat bersifat toksik dan menghambat pertumbuhan dan perkembangan biji *D. laxiflorum* [17]. Toksisitas ammonium ini disebabkan oleh hilangnya gradien muatan pada membran sel sehingga ammonia dapat menembus membrane sel tersebut dan menghambat terjadinya fotofosforilasi [16][18][19]. Sumber nitrogen dalam bentuk nitrat (NO_3^-) pada kultur *in vitro* biasanya ditambahkan dalam konsentrasi 25-40 mM (350-560 mg/l) sedangkan untuk ammonium (NH_4^+) biasanya ditambahkan dalam media kultur dalam konsentrasi 6-20 mM (84-280 mg/l) [20]. Penambahan ammonium dengan konsentrasi lebih dari 280 mg/l dapat bersifat toksik dan menghambat pertumbuhan dan perkembangan. Pada penelitian ini, perlakuan kombinasi ammonium nitrat konsentrasi rendah 63,75 mg/l dengan rasio perbandingan total N 1:1,5 (yang terdiri dari perbandingan amonium:nitrat 26,51:37,24 mg/l) (Tabel 6), menunjukkan total persentase pertumbuhan dan perkembangan tertinggi yaitu 31,1% dan total pertumbuhan dan perkembangan semakin menurun pada konsentrasi tertinggi 510,00 mg/l (yang terdiri dari perbandingan amonium:nitrat 212,12:297,88mg/l) yaitu 8,7%. Perlakuan kombinasi ini memberikan hasil terbaik jika dibandingkan ammonium ataupun nitrat secara tunggal. hal ini diduga karena melalui pemberian kombinasi nitrogen ini penyerapan nitrogen yang dilakukan oleh biji lebih efektif, dimana dua sumber nitrogen yaitu ammonium dan nitrat mampu meningkatkan produksi ammonia dengan baik sehingga sintesis protein untuk pembentukan struktur sel dan diferensiasi sel terjadi lebih baik pula [17]. Metabolisme nitrogen dalam jaringan tanaman diawali dengan masuknya sumber nitrogen yang berada di media kultur, yaitu Ion-ion NO_3^- (anion) atau NH_4^+ (kation) diserap tumbuhan melalui transport aktif, dengan bantuan energi oleh NADPH. Karena permeabilitas membran plasma terhadap ion sangatlah kecil, maka tidak dapat ditembus secara difusi. Sumber nitrat (NO_3^-) yang di serap akan berasimilasi di dalam sel dengan cara, nitrat (NO_3^-) direduksi menjadi nitrit (NO_2^-) oleh enzim nitrat reduktase di sitosol. Ekspresi gen nitrat reduktase (NR) diinduksi oleh adanya nitrat (NO_3^-) yang masuk dalam sel tanaman [21]. selanjutnya perubahan nitrit (NO_2^-) menjadi hiponitrit (HNO) oleh enzim nitrit reduktase, setelah itu hiponitrit diubah menjadi hidrosilamin (NH_2OH) dan selanjutnya menjadi ammonium (NH_4^+) oleh enzim hidrosilamin reduktase di khloroplas, selanjutnya dalam bentuk ammonium ini akan segera mengalami sintesis lebih lanjut menjadi senyawa-senyawa organik baik yang berupa asam amino, amida maupun senyawa lainnya. Sedangkan kelebihan nitrat (NO_3^-) akandibawa menuju ke sel mesophyll melalui xylem. Di mana nitrat dapat sementara disimpan di dalam vakuola. Kenaikan sintesis senyawa ini akan menambah protein sebagai hasil sintesisnya [7][22]. Sehingga dapat dikaitkan dalam penelitian ini ketersediaan unsur nitrogen pada media dengan konsentrasi optimal berfungsi

penting pada proses pertumbuhan dan perkembangan biji anggrek *D. laxiflorum*.

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Analisa statistika menunjukkan bahwa sumber nitrogen, dan konsentrasi nitrogen, serta interaksi antara keduanya berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji *D. laxiflorum*. Sumber nitrogen yang memberikan respon persentase total pertumbuhan dan perkembangan tertinggi (31,1%) pada biji *D. laxiflorum* adalah kombinasi antara ammonium dan nitrat dengan konsentrasi terendah yaitu 63,75 mg/l.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Ibu Tutik Nurhidayati, S.Si., M.Si dan Ibu Siti Nurfadilah S.Si., M.Sc., selaku dosen pembimbing. Terimakasih kepada Ibu Indah Trisnawati D.T., S.Si., M.Si., Ph.D., Ibu Dra. Nurlita Abdulgani, M.Si., dan Ibu Ir. Sri Nurhatika M.P., Terimakasih kepada Bapak Dr. R. Hendrian, M.Sc., selaku Kepala UPT BKT Kebun Raya Purwodadi LIPI beserta staff. Terimakasih Kepada Ibu Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] E. Panjaitan, "Respon Pertumbuhan tanama nanggrek (*Dendrobium* sp.) Terhadap pemberian BAP dan NAA secara in vitro," Jurnal penelitian bidang ilmu pertanian, Vol 3 no 3, (2005) 45-51.
- [2] A. R. Risna, Y.W.C. Kusuma, D. Widyatmoko, R. Hendrian, D.O. Pribadi., *Spesies Prioritas untuk Konservasi Tumbuhan Indonesia*. Seri I. Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor: LIPI (2010) 1-30.
- [3] S. Mursidawati, "Asosiasi Mikoriza dalam Konservasi Anggrek Alam," Buletin Kebun Raya Indonesia. Volume 10 no 1 (2007) 24 – 30.
- [4] Temjensangba dan C. R. Deb, "Effect of Different Factors on Non Symbiotic Seed Germination, Formation of Protocorm Like Bodies and Planlet Morphology of *Cleisostoma Racemiferum* (Lindl.) Garay," Indian Journal of Biotechnology, Vol 5-06-2006 (2006) 223 – 228.
- [5] S. Nontachaiyapoom, S. Sasirat., dan L. Manoch, "Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand, Scientia Horticulturae, Vol 130 (2011) 303–308.
- [6] Zulkarnain, *Kultur Jaringan Tanaman Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya*. Jakarta: Bumi Aksara (2009).
- [7] F. B. Salisbury, dan C. W. Ross, 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid I* (di terjemahkan oleh Diah R, Lukman dan Sumaryono). Bandung: ITB (2009).
- [8] J. Arditti, *Micropropagation of Orchids*, Second edition, Volume I. Australia: blackwell publishing (2008).
- [9] V. J. Raghavan dan G. Torrey, "Inorganic Nitrogen Nutrition of The Embryos of The *Orchid Cattleya*," Amer. Jour. Bot, Vol 50(6) pt. 2 (1963) 617.
- [10] N. Majerowicz, G.B. Kerbauy, C.C. Nievola, dan R.M. Suzuki, "Growth and Nitrogen Metabolism of *Catsetum fimbriatum* (orchidaceae) Grown With Different Nitrogen Sources," Environmental and Experimental Botany. Volume 44(2000) 195–206.
- [11] E. Dijk, dan N. Eck. " Ammonium Toxicity and Nitrate Response of Axenically Grown *Dactylorhiza Incarnata* Seedlings". Laboratory of Plant Ecology, Department of Plant Biology, Biological Centre, University of Groningen, P.O. Box 14, 9750 AA Haren, The Netherland. New Phytot (1995) 131, 361-367.
- [12] P. Seaton, dan M. Ramsay, *Growing Orchids from Seed*, Kew : Royal Botanical Gardens (2005).
- [13] R. Vasudevan, dan J.V. Staden, "In Vitro Asymbiotic Seed Germination and Seedling Growth of *Ansellia africana* Lindl.," Scientia Horticulturae. Vol 123, (2010) 496-504.
- [14] A.R. Roy, R.S. Patel., V.V. Patel., S. Sajeev., dan C.D. Bidyut 2011. "Asymbiotic Seed Germination, Mass Propagation and Seedling Development of *Vanda coerulea* Griff Ex. Lindl. (Blue Vanda) an *In Vitro* Protocol for An Endangered Orchid," Scientia Horticulturae, Vol 128, (2011) 325 – 331.
- [15] M.M. Hossain, M. Sharma., J.A.T.D. Silva, dan P. Pathak. "Seed Germination and Tissue Culture of *Cymbidium giganteum* Wall.ex Lindl.," Scientia Horticulturae. Vol 123, (2010) 479–487.
- [16] L. Taiz, dan E. Zeiger., 2002. *Palnt physiology*. Third edision. Sinauer Associates. Halaman 67 – 85 dan 259 – 280.
- [17] S.B. Hosiholan, M.P, M.S Suprihatin dan R.I. Muryas, "Pengaruh Perbandingan Nitrat dan Ammonium Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Selada (*Lactusa sativa* L.) yang di Budidayakan secara Hidroponik," Proc Seminar Nasional Pengembangan Teknologi Hortikultura Memasuki Indonesia Baru. Salatiga, Fakultas Pertanian UKSW, (2000) 36-43.
- [18] K. Mengel, dan E.A Kirkby, *Principles of Plant Nutrition*. Switzerlan:International Potash Institute, (1982) 655.
- [19] D. Widiastoety, "Pengaruh KNO₃ dan (NH₄)₂SO₄ Terhadap Pertumbuhan Bibit Anggrek Vanda". Balai Penelitian Tanaman Hias. J Hort. Vol 18 (3), (2007) 307 – 311.
- [20] K.C. Torres, *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*, , New York Van Nostrand Reinhold: An AVI Book (1989).
- [21] A.S. Mizwar., Tri., dan U. Kharistiningrum, "Aktivitas Enzim Metabolisme Nitrat dan Sukrosa Daun Kedelai Fase Awal Berbunga (R1) pada Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam," Jember : Pusat Penelitian Biologi Molekul dan Fakultas Pertanian Universitas Jember (2004).
- [22] S. Parman, "Kandungan Protein dan Abu Tanaman Alfalfa (*Medicago sativa* L) setelah Pemupukan Biorisa. BIOMA," Laboratorium Struktur dan Fungsi Tumbuhan, Jurusan Biologi FMIPA Undip. Vol. 9, No. 2 (2007), 38-44.