



**Distribusi Enzim Nitrat Reduktase pada Cabai Merah (*Capsicum annuum*)
dalam Rangka Mendukung Sistem *Agroforestry* Berkelanjutan**

I Gde Adi Suryawan Wangiyana¹⁾, Wayan Wangiyana²⁾

¹⁾ Fakultas Ilmu Kehutanan Universitas Nusa Tenggara Barat

²⁾ Fakultas Pertanian Universitas Mataram

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui distribusi enzim nitrat reduktase pada tanaman cabai merah (*C. annuum*) yang dipengaruhi oleh berbagai faktor fisiologis. Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan banyak faktor diantaranya: Faktor organ tanaman, umur tanaman, posisi daun dan pemupukan dengan nitrat. Berbagai organ tanaman cabai direndam dalam buffer fosfat pH 7,5 selama 20 menit. Setelah itu dilakukan penambahan susbtrat berupa 0,1M NaNO₃ dan diinkubasi selama 60 menit. Sampel selanjutnya direndam dalam larutan Naphylediamine dan Sulfanilamide 1:1. Absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540nm. Berdasarkan pengukuran absorbansi diperoleh hasil bahwa tanaman cabai usia dewasa memiliki aktivitas nitrat reduktase lebih tinggi dibandingkan dengan usia muda dan tua. Aktivitas nitrat reduktase pada organ daun lebih tinggi dibandingkan organ akar, batang dan buah. Sementara itu daun pada posisi pucuk memiliki aktivitas nitrat reduktase lebih tinggi dibandingkan dengan daun di posisi pangkal dan tengah. Pemupukan nitrat tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas nitrat reduktase pada tanaman cabai. Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa *Capsicum annuum* usia dewasa memiliki aktivitas nitrat reduktase tertinggi dengan kecenderungan organ daun memiliki aktivitas nitrat reduktase terbesar dibandingkan organ lainnya terutama daun pada posisi pucuk. Penambahan susbtrat NaNO₃ tidak memberikan pengaruh secara signifikan terhadap aktivitas nitrat reduktase.

Kata kunci: *Capsicum annuum*, Distribusi, Nitrat Reduktase

**Distribution of Nitrate Reductase Enzymes in Red Chili (*Capsicum annuum*) in
Order to Support Sustainable Agroforestry Systems**

I Gde Adi Suryawan Wangiyana¹⁾, Wayan Wangiyana²⁾

¹⁾ Fakultas Ilmu Kehutanan Universitas Nusa Tenggara Barat

²⁾ Fakultas Pertanian Universitas Mataram

Abstract

This study aims to determine the distribution of the enzyme nitrate reductase in red chili plants (*C. annuum*) which are influenced by various physiological factors. This experiment uses a completely randomized design with many factors including: Plant

organ factors, plant age, leaf position and fertilization with nitrates. Various organs of chili plants are immersed in phosphate buffer pH 7.5 for 20 minutes. After that the addition of substrate in the form of 0.1 M NaNO_3 and incubated for 60 minutes. The samples were then immersed in Naphthylethylamine and Sulfanilamide 1: 1 solutions. Sample absorbance was measured by a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm. Based on absorbance measurements, the results showed that adult chili plants had higher nitrate reductase activity compared to young and old age. The activity of nitrate reductase in leaf organs is higher than that of root, stem and fruit organs. Meanwhile the leaves in the shoot position have higher nitrate reductase activity compared to the leaves in the base and middle positions. Nitrate fertilization did not have a significant effect on nitrate reductase activity in chili plants. Based on this, it can be concluded that the adult age *Capsicum annum* has the highest nitrate reductase activity with the tendency of leaf organs to have the greatest nitrate reductase activity compared to other organs, especially leaves in the shoot position. The addition of NaClO_3 does not significantly influence the activity of nitrate reductase.

Keywords : *Capsicum Annum*, Nitrat Reduktase, Distribution

PENDAHULUAN

Agroforestry adalah suatu sistem penggunaan bersama untuk ditanami tegakan tanaman hutan dan tanaman pertanian. Sistem ini merupakan salah satu bentuk ekstensifikasi pertanian melalui perluasan areal pertanian di lahan hutan yang dilakukan secara sinergis sehingga hutan tetap lestari. *Agroforestry* terutama bertujuan untuk mengoptimalkan hasil suatu bentuk penggunaan lahan secara berkelanjutan untuk menjamin dan memperbaiki kebutuhan bahan pangan (Mayrowani dan Ashari, 2011)

Cabai merah (*Capsicum annum*) merupakan salah satu komoditi pertanian yang potensial untuk dikembangkan dengan sistem *Agroforestry*. Tanaman ini dapat tumbuh secara sinergis dengan tegakan tanaman hutan. *Agroforestry* Tanaman cabai dapat dilakukan dengan tanaman sengon (*Falcataria moluccana*) dengan hasil *Land Equivalent Ration* (LER) yang menjanjikan (Rachman dan Hani, 2014). Cabai merah juga umum dijadikan tanaman semusim yang dalam sistem agrisilvikultur dengan beberapa tanaman berkayu diantaranya Mahoni (*Swietenia* sp), Jati (*Tectona grandis*), Rambutan (*Nephelium lappaceum*), Pinang (*Areca catechu*) dan Nangka (*Artocarpus integra*) pada lahan kritis (Bukhari dan Febryano, 2010).

Permasalahan pengembangan cabai merah (*C. annum*) dengan pola *agroforestry* adalah hambatan pertumbuhan cabai karena adanya naungan dari tanaman hutan. Cabai merah termasuk tanaman yang butuh penyinaran cukup sehingga adanya naungan dapat menyebabkan adanya stress lingkungan yang harus direspon secara adaptif (Khoiri, 2010). Penurunan produktivitas cabai merah karena adanya naungan ini dapat diatasi dengan optimalisasi pertumbuhan melalui optimalisasi penyerapan nutrisi dari media pertumbuhan. Salah satu kriteria optimalisasi penyerapan nutrisi pada tanaman cabai merah adalah melalui pengamatan aktivitas enzim nitrat reduktase.

Aktivitas Enzim Nitrat reduktase dan distribusinya pada tanaman dipengaruhi oleh banyak faktor fisiologis. Aktivitas Nitrat reduktase dapat distimulasi oleh growth regulator dan tetap aktif meskipun dalam keadaan kurang cahaya (Hemalatha, 2002). Aktivitas nitrat reduktase dipengaruhi oleh suhu lingkungan dengan kecenderungan bahwa suhu semakin tinggi dapat mempercepat aktivitasnya (Shaner and Boyer, 1976). Menurut Gaikwad *et al.*, (2013), stress berupa cekaman kondisi kering memberikan

respon terhadap nitrat reduktase berupa peningkatan aktivitasnya jika dibandingkan dengan tanaman cabai kontrol.

Berdasarkan studi yang telah disebutkan diatas, aktivitas nitrat reduktase sangat mendukung adaptasi fisiologis tanaman cabai sehingga studi terhadap aktivitas enzim ini diperlukan untuk peningkatan kualitas pertumbuhan tanaman cabai, terutama jika dijadikan tanaman *agroforestry*. meskipun studi aktivitas nitrat reduktasi pada tanaman cabai telah dilakukan, namun secara spesifik studi tentang distribusi enzim tersebut masih sangat jarang dilakukan. Padahal enzim nitrat reduktase terdistribusi secara tidak merata pada tanaman (Hansch *et al.*, 2001). Studi distribusi enzim nitrat reduktase pada tanaman cabai merah (*C. annuum*) dapat memberikan informasi menyeluruh terkait upaya peningkatan pertumbuhan tanaman ini terutama jika dibudidayakan dengan sistem *agroforestry*. oleh karena itulah penelitian ini bertujuan untuk mengetahui distribusi enzim nitrat reduktase pada tanaman cabai merah (*C. annuum*) yang dipengaruhi oleh berbagai faktor fisiologis.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat – alat yang digunakan dalam praktikum ini antara lain: tabung reaksi dan rak tabung reaksi, botol film gelap, pipet ukur dan filler, vortex, spektrofotometer UV-Vis, pisau silet dan alas untuk membuat irisan, timbangan semi analitik, mikropipet. Bahan–bahan yang digunakan dalam praktikum ini antara lain: sampel berupa: tanaman cabai merah (*C. annuum*), 5 M NaNO₃, 0,6 M NaNO₂, 0,1 M buffer fosfat pH7,5, 0,02% Naphtyldiamine (NED), 1% sulfanilamide (SA) dalam 3 N HCl dan akuades.

Rancangan Percobaan

Percobaan ini disusun menggunakan dengan rancangan acak lengkap dengan beberapa faktor yang dijadikan sebagai parameter. Faktor–faktor tersebut tidak saling terkait satu sama lain sehingga bukan merupakan percobaan faktorial.

Faktor organ tanaman *C. annuum* (O)

- O1 : Organ akar
- O2 : Organ Batang
- O3 : Organ Daun
- O4 : Organ Buah

Faktor umur tanaman *C. annuum* (U)

- U1 : Usia Tanaman Muda
- U2 : Usia Tanaman Dewasa
- U3 : Usia Tanaman Tua

Faktor Posisi Daun *C. annuum*

- D1 : Posisi Daun di Pucuk
- D2 : Posisi Daun di Tengah
- D3 : Posisi Daun di Pangkal

Faktor Pemupukan dengan Nitrat

- N1 : Pemupukan NaNO₃ 0 M (tanpa pemupukan)
- N2 : Pemupukan NaNO₃ 0,1 M
- N3 : Pemupukan NaNO₃ 0,2 M
- N4 : Pemupukan NaNO₃ 0,4 M

Prosedur Penelitian

Sampel cabai merah yang akan digunakan berupa: akar, batang, daun dan buah dibersihkan dari debu, air ataupun kotoran yang melekat padanya. Sampel selanjutnya diiris dengan ukuran ± 2 mm dengan menggunakan silet. Sebanyak 10 gr sampel yang telah diiris dimasukkan kedalam botol film gelap untuk diproses lebih lanjut. Preparasi sampel harus dilakukan dalam waktu sesingkat – singkatnya.

Reaksi sampel dengan substrat

Sebanyak 5 mL buffer fosfat pH 7,5 ditambahkan pada irisan sampel dalam tabung film gelap. Perendaman sampel dilakukan selama 20 menit. Setelah 20 menit buffer fosfat yang digunakan untuk merendam irisan sampel dibuang dan diganti dengan 5 mL buffer yang sama. Ditambahkan substrat enzim berupa 100 μ l larutan 5 M NaNO_3 (konsentrasi akhir 0,1 M) kemudian diinkubasi selama 60 menit. Selama waktu inkubasi, disiapkan tabung reaksi berisi 200 μ l larutan 0,02% NED dan 200 μ l larutan 1% SA dalam 3 N HCl. Setelah selesai waktu inkubasi, diambil 100 μ l aliquot hasil rendaman irisan sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan NED dan SA. Setelah 10 menit dalam tabung reaksi ditambahkan 2,5 ml akuades kemudian campuran dihomogenasi dengan vortex. Diukur dan dicatat nilai absorbansi campuran tersebut dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Narayana and Sunil, 2009)

Pembuatan kurva standar NO_2^- (nitrit)

Dibuat 10 ml larutan NO_2^- (BM = 46) dengan konsentrasi 4 nmol/100 μ l atau setara dengan larutan NaNO_2 (BM = 69) dengan konsentrasi 6 nmol/100 μ l atau 60 nmol/1000 μ l = 60 μ M. disiapkan 8 tabung reaksi yang diisi dengan larutan seperti yang tertera pada tabel 1.

Tabel 1. Pembuatan campuran larutan untuk penentuan kurva standar nitrit

Larutan	Nomor Tabung							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsentrasi NO_2^- (nmol)	0	4	8	12	16	20	24	28
Larutan NaNO_2 60 μ M (μ l)	0	100	200	300	400	500	600	700
NED (μ l)	200	200	200	200	200	200	200	200
SA (μ l)	200	200	200	200	200	200	200	200
Akuades (μ l)	2600	2500	2400	2300	2200	2100	2000	1900
Volume total (μ l)	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000

Absorbansi sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Masing-masing konsentrasi nitrit dibuat grafik hubungan antara konsentrasi nitrit dengan nilai absorbansinya kemudian dibuat persamaan regresi liniernya. Selanjutnya dari persamaan regresi linier, konsentrasi nitrit pada sampel dapat dicari dengan memasukkan nilai absorbansi sampel sebagai nilai Y pada kurva standar untuk mencari nilai X.

$$Y = aX + b$$

Penentuan nilai aktivitas nitrat reduktase in vivo

Penentuan nilai aktivitas ditentukan berdasarkan volume, massa dan waktu inkubasi dengan menggunakan rumus:

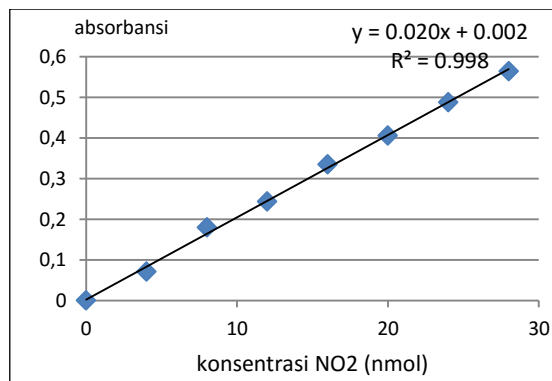
$$\mu\text{mol NO}_2 - \text{x} \frac{5 \text{ ml}}{0,1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{60 \text{ menit}}{\text{waktu inkubasi } 60 \text{ menit}}$$

Analisis Data

Data ditampilkan dalam bentuk grafik dan diagram batang. Untuk pembuatan kurva standar ditampilkan dalam grafik menggunakan pendekatan regresi linier. Sementara pengukuran aktivitas nitrat reduktase pada berbagai faktor seperti yang tertera pada rancangan percobaan ditampilkan dalam bentuk diagram batang. Analisis standar error pada taraf 0,05 digunakan sebagai acuan untuk menentukan signifikansi antar perlakuan pada diagram batang.

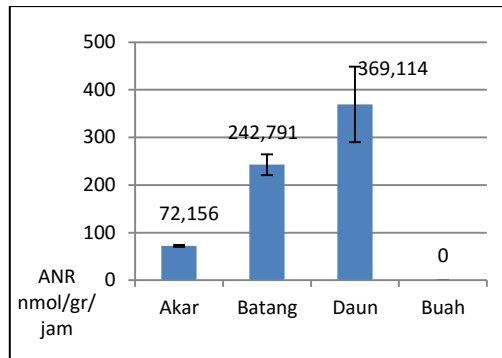
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran larutan standar digunakan untuk membuat kurva standar. Kurva standar yang dibuat digunakan sebagai pendekatan nilai absorbansi NO₂ pada berbagai konsentrasi berbeda. Selain itu kurva standar juga dapat dijadikan sebagai acuan pengukuran kadar Nitrat secara in vivo.

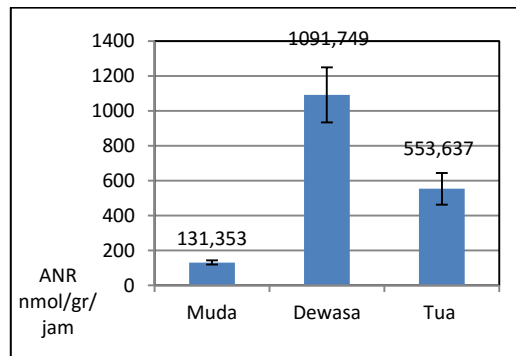


Gambar 1. Kurva standar NO₂ yang diukur dengan spektrofotometer di laboratorium Falitma

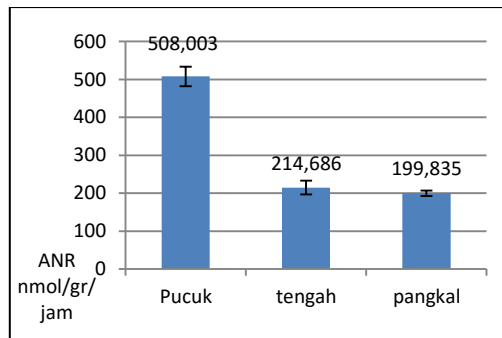
Untuk pengukuran aktivitas nitrat reduktase pada berbagai organ tanaman cabai, berbagai umur tanaman, posisi daun serta pemupukan, data ditampilkan dalam bentuk diagram batang dengan menyertakan error bar melalui analisis standar error dengan taraf signifikansi 0,05. Batas atas dan batas bawah antar diagram menentukan beda nyata antar perlakuan.



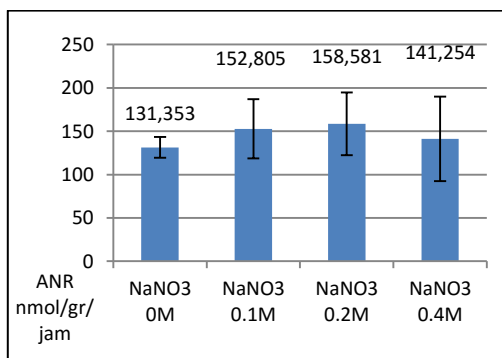
Gambar 2. Perbandingan Aktivitas Nitrat Reduktase pada Berbagai Organ Tanaman Cabai dengan Analisis Standar error.



Gambar 3. Perbandingan Aktivitas Nitrat Reduktase pada berbagai Umur Tanaman dengan Analisis Standar Error.



Gambar 4. Perbandingan Aktivitas Nitrat Reduktase pada Berbagai Posisi Daun dengan Analisis Standar Error



Gambar 5. Perbandingan Aktivitas Nitrat Reduktase pada Berbagai Konsentrasi penambahan NaNO3 Melalui Analisis Standar Error

Pembuatan kurva standar dilakukan dengan menggunakan metode spektroskopi yang digunakan juga untuk mengukur aktivitas nitrat reduktase dengan prinsip bahwa Semakin tinggi zat terlarut dalam suatu larutan maka akan semakin besar pula nilai absorbansinya (*Hydrology Project Training*, 2000). Ketika dilakukan spektroskopi terhadap serangkaian larutan nitrit yang konsentrasinya semakin meningkat, maka nilai absorbansi tentunya akan ikut meningkat pula sehingga hubungan antara konsentrasi nitrit (sumbu x) terhadap absorbansi (sumbu y) mengikuti pola regresi linier. Pada tiap regresi linier, terdapat nilai R^2 yang merupakan koefisien dari multiple determination yang merupakan penjumlahan fraksi dari total variasi Y yang direpresentasikan oleh persamaan regresi, atau dengan kata lain merupakan jumlah kuadrat regresi dibagi jumlah kuadrat total. Semakin tinggi nilai R^2 (maksimum 1), maka semakin bagus persamaan regresi tersebut merepresentasikan data (Gaspersz, 1991).

Menurut Black *et al.* (2001) aktivitas nitrat reduktase pada tanaman umumnya paling tinggi pada organ daun. Hal ini sesuai dengan data yang diperoleh dalam penelitian ini bahwa daun cabai memiliki aktivitas nitrat reduktase tertinggi dan berbeda nyata berdasarkan standar error jika dibandingkan dengan organ akar, batang maupun buah (gambar 2). Meskipun rerata aktivitas nitrat reduktase daun cabai tinggi, namun karena nilai standar error yang cukup besar menunjukkan bahwa data aktivitas nitrat reduktase pada daun kurang presisi. Aktivitas tertinggi kedua terdapat pada organ batang kemudian diikuti oleh akar. Sementara pada organ buah, sama sekali tidak ditemukan adanya aktivitas nitrat reduktase.

Hal yang menarik untuk dicermati adalah aktivitas nitrat reduktase pada batang lebih tinggi dibandingkan akar, padahal menurut Hansch *et al.* (2001), tanaman menyerap nitrat dari tanah sehingga akar merupakan organ yang terdekat dari sumber nitrat, ditambahkan lagi menurut Black *et al.* (2001), terdapat kesetimbangan aktivitas nitrat reduktase antara organ yang dekat dengan sumber energi (daun) dengan organ yang dekat dengan sumber nitrat (akar). Berdasarkan hal tersebut, seharusnya aktivitas nitrat reduktase tertinggi kedua dimiliki oleh akar, bukan batang. Hal ini mungkin disebabkan oleh penyerapan nitrat yang tinggi oleh akar sehingga akar mendeponasikan semua nitratnya ke daun melalui batang.

Berdasarkan usia tanaman, terlihat bahwa aktivitas nitrat reduktase paling tinggi terjadi pada tanaman dewasa dan berbeda nyata ditinjau dari nilai standar errornya dibandingkan tanaman muda dan tua (gambar 3). Tanaman dewasa cenderung merupakan tanaman yang laju metabolismenya cepat dan aktivitasnya kompleks termasuk dalam fotosintesis yang menghasilkan energi utama untuk pertumbuhan. Menurut Srivastava (1980), energi diperlukan dalam aktivitas nitrat reduktase sehingga nilai aktivitas nitrat reduktase yang tinggi pada tanaman dewasa merupakan hal yang wajar. Pada tanaman muda, aktivitas metabolisme juga pesat namun terdapat keterbatasan berupa kompleksitas organ yang tidak sebaik tanaman dewasa. Sebagai contoh: pada tanaman muda dapat ditemukan daun berwarna hijau muda yang menunjukkan perkembangan kloroplasnya belum sempurna. Sementara itu, pada tanaman tua yang sudah berbuah, laju energi lebih diutamakan untuk pembentukan buah dibandingkan organ lain sehingga aktivitas nitrat reduktasinya juga lebih kecil dibandingkan individu dewasa. Rerata aktivitas nitrat reduktase pada individu dewasa juga memiliki presisi yang rendah karena nilai Standar error yang cukup tinggi, begitu pula dengan nilai rerata individu tua. Meskipun memiliki aktivitas nitrat reduktase paling rendah, individu muda mempunyai standar error paling baik diantara yang lainnya.

Daun adalah organ yang menjadi target utama penyaluran nitrat dari akar (Hansch *et al.*, 1985). Posisi daun menentukan laju transfer nitrat dari akar karena daun

pada posisi berbeda memerlukan nitrat pada konsentrasi yang berbeda pula. Hal ini didukung oleh hasil penelitian ini yang menyatakan bahwa aktivitas nitrat reduktase tertinggi terdapat pada daun yang berlokasi dibagian pucuk (gambar 4). Bagian pucuk merupakan bagian yang sangat aktif tumbuh sehingga umumnya memperoleh kadar nitrat yang cukup tinggi. Oleh karena itu, daun pada bagian ini akan memiliki aktivitas nitrat reduktase yang tinggi. Aktivitas nitrat reduktase pada daun bagian tengah sedikit lebih tinggi dibandingkan pada bagian pangkal meskipun jika dilihat dari standar error, keduanya tidak berbeda secara signifikan.

Aktivitas nitrat reduktase dipengaruhi oleh substranya yaitu nitrat dan dihambat oleh produknya yaitu nitrit (Anonim, 2013). Tidak seperti tanaman kacang – kacangan yang dapat mengambil nitrogen dalam bentuk terfiksasi dari atmosfer oleh bakteri simbiosisnya (Sharma *et al.*, 2011), tanaman cabai hanya mengambil nitrat yang terlarut dalam tanah. Oleh karena itu, penambahan nitrat pada medium pertumbuhan tanaman cabai tentu saja akan meningkatkan aktivitas nitrat reduktasinya dengan kecenderungan semakin tinggi kadar nitrat yang ditambahkan, maka semakin tinggi aktivitas nitrat reduktasinya. Namun dalam penelitian ini, aktivitas nitrat reduktase tidak terjadi pada penambahan nitrat tertinggi (0,4 M), melainkan pada kadar nitrat 0,2 M (gambar 5). Hal ini kemungkinan terjadi karena aktivitas enzim nitrat reduktase mempunyai titik optimum pada konsentrasi substrat tertentu, sehingga jika konsentrasi substrat ditambahkan lagi, tidak akan terjadi peningkatan aktivitas enzim atau dapat dikatakan enzim sudah jenuh. Hal yang menarik untuk dicermati adalah dari standar error, sebetulnya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara aktivitas nitrat reduktase pada berbagai penambahan kadar nitrat.

PENUTUP

Capsicum annum usia dewasa memiliki aktivitas nitrat reduktase tertinggi dengan kecenderungan organ daun memiliki aktivitas nitrat reduktase terbesar dibandingkan organ lainnya terutama daun pada posisi pucuk. Akan tetapi penambahan susbtrat NaNO_3 tidak memberikan pengaruh secara signifikan terhadap aktivitas nitrat reduktase.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2013. Asistensi dan Petunjuk Praktikum Biokimia Analitik. Laboratorium Biokimia Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Black. B, L. Fuchigami and G. Coleman. 2001. Nitrate Reductase Activity in Leaves, Stems, And Roots Of Hybrid Poplar. *Tree Physiology Peer Reviewed Journal*.
- Bukhari dan Febryano, 2010. Desain agroforestry pada lahan kritis (studi kasus di kecamatan Indrapuri kabupaten Aceh Besar). *Jurnal Perennial*, Vol. 6, No. 1: 53 – 59.
- Campbell, W. H. 1999. Nitrate Reductase Structure, Function and Regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1999 Jun; 50:277-303.
- Campbell, W. H. and J. L. Remmler, Regulation of Corn Leaf Nitrate Reductase Immunochemical Methods for Analysis of the Enzyme's Protein Component. *Plant Physiology*. (1986) 80, 435-441
- Chanda, S. V. 2003. Factors Affecting Nitrate Reductase Activity in Some Monocot and Dicot Species. *Journal of Plant Biology*, March 2003, 46(1) : 41-45

- Delfini, R., C. Belgoff E. Fernandez ,A. Fabra S. Castro. 2010. Symbiotic nitrogen fixation and nitrate reduction in two peanut cultivars with different growth habit and branching pattern structures. *Plant Growth Regul* (2010) 61:153–159
- Gaikwad, S.E., R. A. Shinde, R. B. Thoke and V. T. Aparadh. Potential of drought stress in two varieties of capsicum annum grown in maharashtra. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 2013, 3(2)
- Gaspersz, V., 1991. *Metode Perancangan Percobaan untuk Ilmu ilmu Pertanian, Ilmu-ilmu Teknik dan Biologi*. CV Armico. Bandung.
- Hageman, R. H. and D Flesher. Nitrate reductase activ-ity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant physiology*. March 5, 1960.
- Hansch, R., D. G. Fessel, C. Witt, C. Hesberg, G. Hoffmann, P. Walch-Liu, C. Engels, J. Kruse, H. Rennenberg, W. M. Kaiser and R. R. Mendel., 2001. Tobacco plants that lack expression of functional nitrate reductase n roots show changes in growth rates and metabolite accumulation. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 52, No. 359, pp. 1251 – 1258, 2001.
- Hemalatha S.2002. Regulation of nitrate reductase activity in rice (*Oryza sativa* l.) by growth regulators. *Journal of Central European. Agriculture*, Volume 3 (2002) No. 3
- Hunter, W. J., 1985. Soyabean Stem *In Vivo* Nitrate Reductase Activity. *Annals of Botany*. Volume 55. Issue 5. Pp. 759-761
- Hydrology Project Training. 2000. Absorbtion spectroscopy. <http://cwc.gov.in/main/HP/download/34%20Absorption%20Spectroscopy.pdf>. Diakses: 8 Agustus 2018
- Kevin, V. 2010. Spectrophotometry http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetcs/Spectrophotometry#Beer-Lambert_Law. Diakses: 8 Mein 2013.
- Khoiri, 2010. Pengaruh naungan terhadap pertumbuhan dan laju fotosintesis tanaman cabe merah (*Capsicum annum*) sebagai salah satu sumber belajar biologi. *Bioedukasi Jurnal Pendidikan Biologi* Volume 1, No 2 Nopember 2010
- Leong. C. C. and T. C. Shen. 1982. Occurrence of Nitrate Reductase Inhibitor in Rice Plants. *Plant Physiol.* (1982) 70, 1762-1763
- Mayrowani, H. dan Ashari, 2011. Pengembangan agroforestry untuk mendukung ketahanan pangan dan pemberdayaan petani sekitar hutan. *Forum Penelitian Agro Ekonomi* Vol. 29, No. 2 Desember 2011: 83 – 98.
- Narayana. B. and K. Sunil, 2009. A Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite and Nitrate. *Eurasian J. Anal. Chem.* 4(2): 204-214, 2009
- Nelson. D. L and M. M Cox. 2005. *Lehninger Principle of Biochemistry* fourth edition. W. H Freeman and Company. New York
- Pearson, C. J. and Barrie T. Steer. 1977. Daily changes in nitrate uptake and metabolism in *Capsicum annum*. *Planta*. 25. XI. 1977, Volume 137, Issue 2, pp 107-112
- Rachman, E. dan A. Hani, 2014. Pola agroforestry sengon (*Falcataria moluccana* L) dan cabai merah keriting di dataran tinggi Ciamis Jawa Barat. *Jurnal Penelitian Agroforestry* Vol. 2. No. 1, Agustus 2014: 35 – 44.
- Shaner, D. L. and J. S. Boyer. Nitrate Reductase Activity in Maize (*Zea mays* L.) Leaves. Regulation by Nitrate Flux. *Plant Physiology*. (1976) 58, 499-504
- Sharma, P. V. Sardana and S.S. Kandola. 2011. Response of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to *Rhizobium* Inoculation. *Libyan Agriculture Research Center Journal International* 2 (3): 101-104, 2011
- Shen, T. C., 1972. Variation in the nitrate reductase of rice seedlings. *Planta*. 26. IX. 1972, Volume 108, Issue 1, pp 21-28

- Srivastava, H. S. 1999. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry*. Volume 19, Issue 5, 1980, Pages 725–733
- Subbaiah, C. C. and D. Balasimha, 1983. Nitrate Reductase Activity During Ontogeny of the Fruit of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* 10(1) 9 – 14
- Wakhloo, J. L. and A. Staudt. Development of Nitrate Reductase Activity in Expanding Leaves of *Nicotiana tabacum* in Relation to the Concentration of Nitrate and Potassium. *Plant Physiol.* (1988) 87, 258-263
- Zatar, N. A., M. A. Abu-Eid, A. F. Eid, 1999. Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate using phosphomolybdenum blue complex. *Talanta* 50 (1999) 819–826.