

NITRATE ACTIVITIES REDUCTASE OF *Capsicum annum* L. BY *IN VIVO* WITH SPECTROPHOTOMETRY**AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE *Capsicum annum* L. SECARA *IN VIVO* DENGAN SPEKTROFOTOMETRI****Umi Kulsum Nur Qomariah**

Agroekoteknologi

Universitas KH. A. Wahab Hasbullah



©2019 –EPiC Universitas KH. A. Wahab Hasbullah Jombang ini adalah artikel dengan

akses terbuka di bawah lisensi CC BY-NC-4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).**ABSTRACT**

Nitrate is the main source of nitrogen which is most common in higher plants, taken by roots to be translocated to shoots, then stored in vacuoles and assimilated into reduced N products. Increased activity of the enzyme nitrate reductase is related to energy to reduce nitrate and provide a large capacity for amino acid synthesis, protein or total N assimilation. Nitrate Reductase activity in every part of an organ in one plant can vary from one another. This study aims to explore the activity of nitrate reductase and its relationship to the physiological conditions of plants in *Capsicum annum* L. *in vivo*. The research method used is experimental on a laboratory scale. Research samples include leaves, roots, stems, fruit. The sample was smoothed and then incubated in a buffer solution for 60 minutes. Aliquots are mixed with several chemocines and then checked the absorbance of the spectrophotometer with λ 540 nm. The pink color in the sample solution showed nitrate reductase activity. The absorbance value of the sample is compared with the standard nitrite curve. The results showed that the physiological factors of chilli plants proved to be able to influence the value of Nitrate Reductase Activity. The highest activity of nitrate reductase was in *Capsicum annum* L., found in leaf organs. mature plants, shoots and plants given N fertilizer

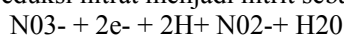
Keywords: Reductase Nitrat; *Capsicum*; Phisiological**ABSTRAK**

Nitrat merupakan sumber utama unsur nitrogen yang paling umum pada tumbuhan tingkat tinggi, diambil oleh akar untuk ditranslokasikan ke pucuk, lalu disimpan dalam vakuola dan diasimilasi menjadi produk N tereduksi. Peningkatan aktivitas enzim nitrat reduktase terkait dengan tenaga untuk mereduksi nitrat serta memberi kapasitas yang besar untuk sintesis asam amino, protein atau asimilasi N total. Aktivitas Nitrat Reduktase pada setiap bagian organ dalam satu tumbuhan dapat bervariasi antara satu dengan lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi Aktivitas Nitrat Reduktase dan hubungannya dengan kondisi fisiologis tanaman pada tanaman *Capsicum annum* L. secara *in vivo*. Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimental dalam skala laboratorium. Sampel penelitian meliputi daun, akar, batang, buah. Sampel dihaluskan kemudian diinkubasi dalam larutan buffer selama 60 menit. Aliquot dicampur beberapa kemikalia kemudian dicek absorbansinya pada spektrofotometer dengan λ 540 nm. Warna merah muda pada larutan sampel menunjukkan adanya aktivitas nitrat reduktase. Nilai absorbansi sampel dibandingkan dengan kurva standar nitrit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa faktor fisiologis tanaman cabai terbukti dapat mempengaruhi nilai Aktivitas Nitrat Reduktase. Aktivitas Nitrat Reduktase tertinggi pada *Capsicum annum* L., terdapat pada organ daun, tanaman dewasa, daun pucuk dan tanaman yang diberi pupuk N.

Kata Kunci: Nitrat reduktas; *Capsicum*; fisiologis

PENDAHULUAN

Nitrat reduktase adalah enzim sitosolik yang mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit dengan menggunakan NADH/NADPH sebagai donor elektron dan merupakan enzim pertama yang terlibat dalam jalur asimilasi nitrat [1]. Adapun reaksi reduksi nitrat menjadi nitrit sebagai berikut:



Nitrat merupakan sumber utama unsur nitrogen yang paling umum pada tumbuhan tingkat tinggi, diambil oleh akar untuk ditranslokasikan ke pucuk, lalu disimpan dalam vakuola dan diasimilasi menjadi produk N tereduksi. Meningkatnya aktivitas nitrat reduktase menunjukkan bahwa semakin meningkat pula tenaga untuk reduksi nitrat serta memberi kapasitas yang besar untuk sintesis asam amino, protein, atau asimilasi N total [2]. Enzim ini merupakan enzim regulator dalam metabolisme N dan bertanggungjawab dalam proses reduksi nitrat menjadi N amonia, yang kemudian digunakan untuk sintesis asam amino.

Ketersediaan nitrat, adanya zat pengatur tumbuh (fitohormon), intensitas cahaya, serta parameter lingkungan dan fisiologis lain merupakan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas nitrat reduktase. Nitrat reduktase tergolong substrate-inducible enzyme, dimana aktivitasnya dapat diinduksi oleh substratnya, yaitu nitrat (NO_3^-). Jika kadar nitrat di dalam tanah rendah, senyawa tersebut akan langsung direduksi di akar. Sedangkan jika kadarnya tinggi, nitrat ditranslokasikan terlebih dulu ke daun dan direduksi di organ tersebut. Semakin tinggi kadar nitrat, maka aktivitas nitrat reduktase akan semakin meningkat [3]. Penambahan pupuk yang mengandung N juga dapat dilakukan untuk mengoptimalkan aktivitas enzim ini [4]. Zat pengatur tumbuh, seperti sitokinin, giberelin, benziladenin, dan kinetin, pada kombinasi dan konsentrasi tertentu juga dapat diaplikasikan untuk meningkatkan aktivitas nitrat reduktase [5]. Intensitas cahaya dan kadar CO_2 juga berpengaruh terhadap aktivitas nitrat reduktase, mengingat energi yang digunakan selama proses reduksi nitrat diperoleh dari hasil fotosintesis. Di samping faktor-faktor tersebut, salinitas dan cekaman kekeringan juga mempengaruhi nitrat reduktase dengan menurunkan aktivitasnya [2][1]. Aktivitas nitrat reduktase cenderung lebih tinggi pada jaringan muda. Aktivitas tersebut terus meningkat hingga maksimum pada saat pembungaan penuh dan menurun saat penuaan [6].

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan Aktivitas Nitrat Reduktase pada berbagai organ dan kondisi fisiologis tanaman *Capsicum annum* L

METODE

Metode penelitian ini dilakukan secara eksperimental dalam skala laboratorium. Sampel penelitian yaitu bagian daun pucuk, tengah dan pangkal; bagian akar, batang, daun, dan buah; tanaman sebelum berbunga, saat berbunga, dan saat berbuah; bagian daun dari tanaman yang tidak diberi dan diberi pupuk NaNO_3 0.1, 0.2, dan 0.4M. Bahan khemikalia meliputi 5M NaNO_3 , 0.6M NaNO_2 , 0.1M buffer fosfat pH 7.5, 0.02% NED (naphthylediamine), 1% SA (sulfanilamide) dalam 3N HCl dan akuades untuk pengenceran. Alat yang digunakan meliputi mikropipet, tabung gelap (film), vorteks dan spektrofotometer GENESYS 10 UV.

a. Penentuan kurva standar nitrit (NO_2)

10 ml larutan NO_2^- (BM = 46) dibuat dengan konsentrasi 4 nmol/100 μl atau setara dengan larutan NaNO_2 (BM = 69) dengan konsentrasi 6 nmol/100 μl atau 60 nmol/1000 μl = 60 μM . Serial pengenceran dibuat dengan cara mengencerkan larutan stok 0.6M NaNO_2 100 kali = 6 mM, lalu diencerkan lagi 100 kali = 60 μM .

Delapan buah tabung reaksi disiapkan dan masing-masing diisi dengan komposisi larutan seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi campuran larutan untuk penentuan kurva standar nitrit

Larutan	No. 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 μM (μl)	0	100	200	300	400	500	600	700
NED (μl)	200	200	200	200	200	200	200	200
SA (μl)	200	200	200	200	200	200	200	200
Akuades (μl)	2600	2500	2400	2300	2200	2100	2000	1900
Volume total (μl)	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000

Tabung No.1 merupakan larutan blanko sebagai faktor koreksi, dengan tanpa penambahan larutan NaNO_2 , sedangkan tabung 2 – 8 merupakan larutan standar sebagai acuan pengukuran. Larutan dibuat dengan memasukkan terlebih dahulu NED dan SA ke dalam tabung reaksi untuk memastikan ada/tidaknya kontaminasi. Selanjutnya,

ditambahkan substrat berupa larutan NaNO_2 60 μM , kemudian didiamkan 5 – 10 menit dan ditambah akuades.

Spektrofotometer yang akan digunakan, dipanaskan dahulu selama 5 – 10 menit dan diatur panjang gelombangnya, yaitu 540 nm untuk pengukuran ANR. Spektrofotometer dikalibrasi dengan akuades yang memiliki nilai absorbansi 0. Nilai absorbansi untuk masing-masing konsentrasi nitrit dihitung, lalu dibuat grafik hubungan antara konsentrasi nitrit dengan nilai absorbansinya dan dilengkapi dengan persamaan linear. Nilai absorbansi (Y) dan konsentrasi nitrit (X) dihitung mengikuti persamaan Hukum Lambert-Beer sebagai berikut:

$$\text{Absorbansi standar (Y)} = \frac{\text{Nilai rata-rata konsentrasi nitrit}}{\text{Nilai rata-rata absorbansi}}$$

Atau dengan menggunakan persamaan garis linear:

$$Y = aX + b$$

b. Pengukuran aktivitas nitrat reduktase secara *in vivo*

Sampel dibersihkan dari debu atau air yang menempel, untuk daun dibuang ibu tulang daunnya. Masing-masing sampel dilakukan 3 kali ulangan pengukuran. 1 gram sampel masing-masing ditimbang dan diiris tipis kurang lebih setebal 2 mm. Irisan sampel dimasukkan ke dalam tabung film yang telah berisi 5 ml buffer fosfat pH 7.5 dan direndam selama 20 menit untuk pre-inkubasi. Setelah itu, buffer fosfat rendaman tadi dibuang dengan cara dipipet dan diganti dengan 5 ml buffer yang sama. Substrat enzim berupa 100 μl larutan 5M NaNO_3 (konsentrasi akhir 0.1M) ditambahkan ke dalam rendaman, lalu diinkubasi selama 60 menit. Selama waktu inkubasi, disiapkan tabung reaksi yang berisi 200 μl larutan 0.02% NED dan 200 μl larutan 1% SA dalam 3N HCl. Setelah selesai waktu inkubasi, 100 μl aliquot hasil rendaman irisan sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan NED dan SA, kemudian didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya, ditambahkan 2.5 ml akuades ke dalam tabung reaksi tersebut dan divorteks hingga homogen. Nilai absorbansi dari campuran tersebut diukur dan dicatat dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Warna merah muda pada larutan sampel menunjukkan adanya aktivitas nitrat reduktase. Larutan blanko yang telah dibuat sebelumnya

digunakan sebagai faktor koreksi nilai absorbansi sampel.

c. Pengukuran aktivitas nitrat reduktase secara *in vivo* pada tanaman cabai rawit dengan berbagai perlakuan

Aktivitas nitrat reduktase diukur pada berbagai faktor perlakuan untuk tanaman cabai rawit. Perlakuan tersebut meliputi: (1) pengukuran ANR pada organ akar, batang, daun, dan buah; (2) pengukuran ANR pada tanaman sebelum berbunga, saat berbunga, dan saat berbuah; (3) pengukuran ANR pada daun kedudukan pucuk, tengah, dan pangkal batang; serta (4) pengukuran ANR pada daun dari tanaman yang tidak diberi dan diberi pupuk NaNO_3 0.1, 0.2, dan 0.4M. Pengukuran ANR dilakukan dengan cara yang sama seperti pengukuran ANR pada berbagai jenis tanaman (poin b) dengan waktu inkubasi selama 60 menit. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan 3 kali ulangan pengukuran.

d. Penentuan nilai aktivitas nitrat reduktase secara *in vivo*

Penentuan nilai aktivitas nitrat reduktase pada sampel dilakukan dengan memasukkan hasil penghitungan nilai konsentrasi nitrit dari persamaan regresi linear ke dalam rumus berikut:

$$\text{ANR} = \dots \mu\text{mol NO}_2^- \times \frac{5 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{60 \text{ menit}}{\text{Waktu inkubasi menit}}$$

$$\text{Unit aktivitas nitrat reduktase} = \dots \mu\text{mol NO}_2^-/\text{g berat daun/jam inkubasi}$$

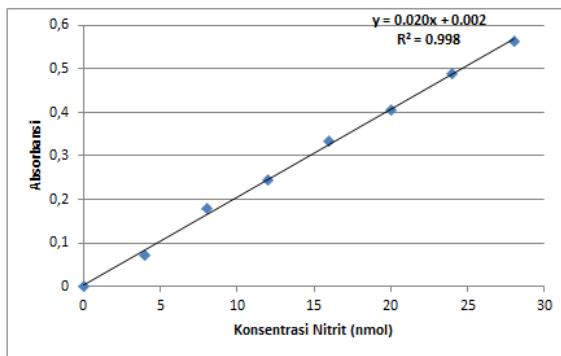
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian antara lain, kurva standar nitrit sebagai acuan pengukuran ANR serta grafik nilai ANR pada berbagai sampel organ tanaman *Capsicum annum* L. Dan perlakuan. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan dengan dua spektrofotometer A dan B. Berdasarkan tabulasi data absorbansi serial konsentrasi nitrit untuk kurva, secara keseluruhan nilainya cukup bagus, namun dipilih dua kurva standar sebagai acuan. Kurva standar yang digunakan sebagai acuan, dipilih berdasarkan nilai regresi yang terbaik (paling mendekati angka 1) dari data yang dihasilkan pada pengukuran absorbansi nitrit untuk kurva standar.

Tabel 2. Nilai Absorbansi Serial Konsentrasi Nitrit

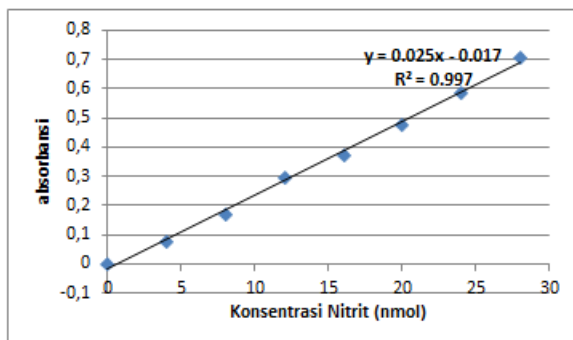
Konsentrasi Nitrit (nM)	Absorbansi λ540					
	A	B	C	D	E	F
0	0	0	0	0	0	0
4	0,063	0,071	0,115	0,075	0,087	0,053
8	0,109	0,180	0,203	0,171	0,189	0,136
12	0,169	0,244	0,315	0,297	0,261	0,209
16	0,385	0,335	0,367	0,371	0,349	0,286
20	0,431	0,406	0,502	0,476	0,444	0,412
24	0,573	0,488	0,639	0,585	0,474	0,434
28	0,608	0,564	0,647	0,703	0,570	0,507

Kurva standar dari data B (Tabel 2) dipakai sebagai acuan untuk penghitungan konsentrasi nitrit sampel yang diukur absorbansinya di Spektrofotometer A, sehingga diperoleh persamaan garis linear seperti pada gambar berikut.



Gambar 1. Kurva standar nitrit hasil pengukuran dengan spektrofotometer A

Kurva standar dari data D (Tabel 2) dipakai sebagai acuan untuk penghitungan konsentrasi nitrit sampel yang absorbansinya diukur dengan spektrofotometer B, sehingga diperoleh persamaan garis linear seperti pada Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Kurva standar nitrit hasil pengukuran dengan spektrofotometer B.

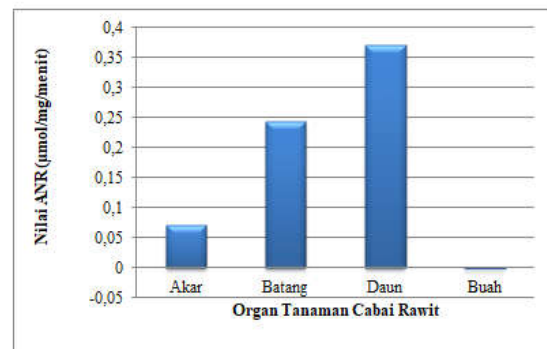
Berdasarkan persamaan garis linear tersebut, nilai konsentrasi nitrit larutan sampel dihitung sebagai x kemudian dimasukkan ke dalam rumus penentuan ANR (Cara kerja, poin d) untuk mendapatkan nilai

aktivitas nitrat reduktase. Hasil pengukuran absorbansi sampel dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penghitungan nilai konsentrasi nitrit dan ANR dapat dilihat di lampiran 3

Tabel 3. Hasil penghitungan nilai konsentrasi nitrit dan ANR

Sampel Tanaman Cabe	Ulangan Pengukuran	Absorbansi λ540	Nilai Nitrit	Nilai ANR
		Inkubasi 60 menit		
A	1	0.114	0.0056	0.28
	2	0.666	0.0332	1.66
	3	0.014	0.0006	0.03
	Rerata ANR			0.65667
B	1	0.051	0.00245	0.1225
	2	0.113	0.00555	0.2775
	3	0.088	0.0043	0.215
	Rerata ANR			0.205

Nilai ANR tanaman cabe rawit kemudian dianalisis lebih lanjut untuk melihat pengaruh dari faktor fisiologis tanaman. Gambar 3 menunjukkan distribusi nitrat reduktase pada berbagai organ tanaman cabai rawit yang meliputi daun, buah, batang dan akar yang dihitung berdasarkan nilai absorbansi sampel (Tabel 4).



Gambar 3. Grafik hubungan antara bagian organ tanaman cabai rawit dengan nilai ANR

Grafik pada Gambar 3 menunjukkan bahwa organ daun memiliki nilai ANR tertinggi, kemudian diikuti oleh batang, akar dan buah. Hasil ini sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa nitrat dari dalam tanah ditranslokasi ke bagian daun segera setelah diserap oleh akar. Pada daun juga tersedia NADH₂/NADPH₂ dalam jumlah yang lebih banyak jika dibandingkan dengan organ lainnya karena daun memiliki banyak klorofil dan merupakan organ utama untuk fotosintesis. Senyawa NADH₂ atau NADPH₂ tersebut berperan sebagai precursor dalam reaksi reduksi nitrat. Namun demikian apabila kadar nitrat pada akar dalam jumlah minimal, maka proses reduksi nitrat langsung diproses di akar. Hal ini mungkin

menyebabkan nilai ANR pada akar dalam praktikum ini juga cukup tinggi. Nilai ANR pada organ batang tidak jauh berbeda dari ANR pada daun. Hal ini mungkin disebabkan oleh distribusi klorofil pada batang tanaman cabai yang cukup melimpah karena tanamannya cabai merupakan tanaman herba. Nilai ANR terendah terdapat pada organ buah cabai karena distribusi nitrat pada organ yang sedang mengalami penuaan sangat terbatas.

Pada sampel daun, dibandingkan berdasarkan umurnya, yaitu antara daun muda (sebelum berbunga, daun dewasa (ketika berbunga) dan daun tua (tanaman berbuah).

Tabel 4. Rerata absorbansi, konsentrasi nitrit dan ANR tanaman cabai berbagai kondisi fisiologis

Parameter fisiologis	Perlakuan	Absorbansi	Nilai Nitrit	ANR
Organ	Akar	0.0186667	0.0014267	0.07133
	Batang	0.1046667	0.0048667	0.24333
	Daun	0.1683333	0.0074133	0.37067
	Buah	0.0013333	-0.000033	-0.0017
Umur	Muda	0.0556667	0.0026833	0.13417
	Dewasa	0.4436667	0.0220833	1.10417
	Tua	0.2613333	0.0111333	0.55667
Posisi daun	Pucuk	0.2383333	0.0113333	0.51067
	Tengah	0.0893333	0.0043667	0.21833
	Pangkal	0.0833333	0.0040667	0.20333
Penambahan	0 M	0.0556667	0.0026833	0.13417
	0.1 M	0.0643333	0.0031167	0.15583
	0.2 M	0.0666667	0.003233	0.16167
NaNO ₃	0.4 M	0.0596667	0.002883	0.14417

Aktivitas nitrat reduktase juga diamati pada berbagai tahap pertumbuhan tanaman cabai rawit yaitu pada tanaman muda (sebelum berbunga), dewasa (akan/sedang berbunga) dan tanaman tua (sedang berbuah). Perbandingan nilai ANR berbagai pertumbuhan ditunjukkan dalam grafik Gambar 4.

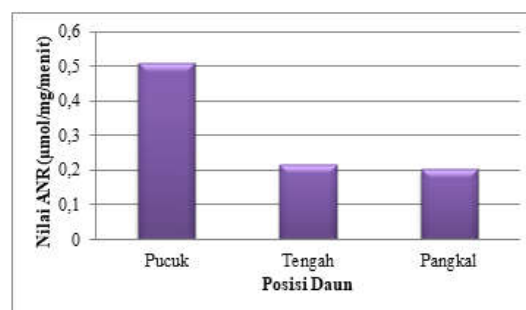


Gambar 4. Grafik hubungan antara umur tanaman cabai rawit dengan nilai ANR

Grafik Gambar 4 menunjukkan nilai ANR tertinggi terdapat pada tanaman cabai dewasa yang akan atau sedang berbunga. Hal ini sesuai dengan teori bahwa aktivitas nitrat reduktase cenderung

lebih tinggi pada jaringan muda dan akan terus meningkat hingga mencapai maksimum pada saat pembungaan penuh atau dewasa kemudian mengalami penurunan pada saat penuaan. Meningkatnya aktivitas nitrat reduktase menunjukkan bahwa semakin meningkat pula tenaga untuk reduksi nitrat serta memberi kapasitas yang besar untuk sintesis asam amino, protein, atau asimilasi N total [2]. Nilai ANR pada daun muda cukup rendah yang kemungkinan dipengaruhi oleh pengambilan sampel daun pada kedudukan batang yang berbeda oleh praktikan. Oleh karena itu maka dilakukan perlakuan untuk mengetahui pengaruh kedudukan daun pada batang terhadap nilai ANR.

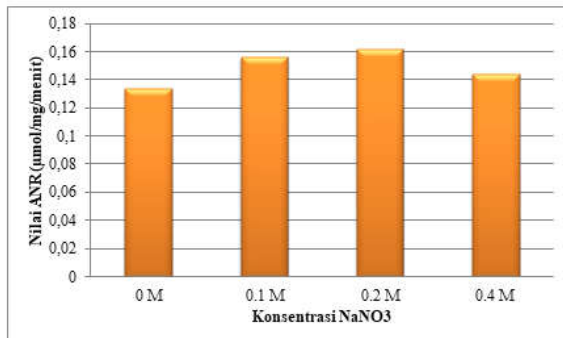
Hubungan antara pengaruh kedudukan daun pada batang terhadap nilai ANR dapat diamati pada grafik Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Grafik hubungan antara kedudukan daun pada batang tanaman cabai rawit dengan nilai ANR

Posisi daun pada pucuk menunjukkan nilai ANR yang paling tinggi pada grafik Gambar 5. Nilai ANR yang tinggi pada bagian pucuk daun, mungkin disebabkan oleh akumulasi nitrat yang lebih tinggi pada bagian pucuk daun jika dibandingkan dengan akumulasi nitrat daun pada kedudukan tengah atau pangkal batang.

Perlakuan keempat dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan pupuk NaNO₃ pada tanaman cabai rawit dengan konsentrasi 0 (sebagai kontrol), 0.1, 0.2 dan 0.4. Gambar 6 menunjukkan bahwa nilai ANR tertinggi dimiliki oleh tanaman dengan penambahan pupuk NaNO₃ 0,2 M sedangkan nilai ANR terendah terdapat pada sampel daun tanaman tanpa pemupukan.



Gambar 5. Grafik hubungan antara penambahan pupuk NaNO₃ pada tanaman cabai rawit dengan nilai ANR

Peningkatan nilai ANR tidak berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi penambahan pupuk nitrat. Aktivitas enzim nitrat reduktase dapat diinduksi oleh substratnya yaitu nitrat. Penambahan pupuk nitrat bertujuan untuk menambah substrat enzim agar aktivitasnya meningkat. Peningkatan aktivitas ini hanya sampai pada konsentrasi tertentu, dimana enzim sudah jenuh terhadap substrat dan tidak ada lagi peningkatan ANR. Perlakuan pemberian pupuk nitrat 0.2 M mungkin menginduksi aktivitas nitrat reduktase pada batas paling optimum. Penambahan pupuk nitrat 0.4 M pada praktikum telah menurunkan aktivitas nitrat reduktase. Enzim nitrat reduktase mungkin telah mengalami kejenuhan pada konsentrasi tersebut sehingga memperlambat dan menurunkan aktivitas nitrat reduktase.

SIMPULAN DAN SARAN

Beberapa simpulan dari penelitian ini antara lain:

1. Faktor fisiologis tanaman terbukti dapat mempengaruhi nilai Aktivitas Nitrat Reduktase.
2. Aktivitas Nitrat Reduktase tertinggi pada perlakuan organ tanaman cabai, terdapat pada organ daun karena pada daun terdapat akumulasi nitrat tertinggi dibanding organ batang, buah dan akar.
3. Aktivitas Nitrat Reduktase tertinggi pada perlakuan umur tanaman cabai, terdapat pada tanaman dewasa jika dibandingkan tanaman muda dan tua.
4. Aktivitas Nitrat Reduktase tertinggi pada perlakuan posisi daun pada batang, terdapat pada daun pada posisi pucuk jika dibandingkan tengah dan pangkal.
5. Aktivitas Nitrat Reduktase tertinggi pada perlakuan penambahan pupuk nitrat terdapat pada perlakuan pupuk 0.2 M, dan peningkatan ANR tidak berbanding lurus dengan penambahan pupuk.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Krček, M., Olšovská, K., Brestič, M., & Slamka, P. 2005. Impact of nitrogen fertilization on nitrate reductase activity in spring barley (*Hordeum vulgare*, L.) leaves under drought stress. *Acta fytotechnica et zootechnica* 1: 25-28.
- [2] Jabeen, N. & Ahmad, R. 2011. Foliar application of potassium nitrate affects the growth and nitrate reductase activity in sunflower and safflower leaves under salinity. *Not Bot Horti Agrobo*, 39(2): 172-178.
- [3] Aslam, M., Rosichan, J.L. & Huffaker, R.C. 1987. Comparative induction of nitrate reductase by nitrate and nitrite in barley leaves. *Plant Physiol.* 83: 579-584.
- [4] Shah, S.H. 2008. Effects of nitrogen fertilisation on nitrate reductase activity, protein, and oil yields of *Nigella sativa* L. as affected by foliar GA3 application. *Turk J Bot.* 32: 165-170.
- [5] Hemalatha, S. 2002. Regulation of nitrate reductase activity in rice (*Oryza sativa*, L.) by growth regulators. *Journal of Central European Agriculture* 3(3): 231-238.
- [6] Bako, S.P. 2006. Effects of plant age, ascorbate and kinetin applications on nitrate reductase activity and leaf protein content of maize (*Zea mays*, L.) plants grown under heat stress. *Asian Journal of Plant Sciences* 5 (2): 363-367.