

ANALISIS NITRAT REDUKTASE SECARA “*IN-VIVO*” PADA TANAMAN JAGUNG, KACANG HIJAU, TEBU, UWI DAN CABAI

Edy Suryono

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo Madura
PO. BOX 2 Telang, Kamal Bangkalan Madura
Email: edysuryono27@yahoo.co.id

Abstract

Nitrate Reductase (NR) is an enzyme that catalyzes the nitrate to nitrite and are inducible because its activity can be enhanced by the addition of substrate. Plants obtain nitrogen by absorbing nitrate or ammonia ions present in the soil, the absorption of ionic compounds are used to form various nitrogen compounds such as proteins. The purpose of this study are : (1) measure, analyze the activity of nitrate reductase (ANR) maize plant leaves, green beans, sugar cane, chili, uwi and chili in “in-vivo”, (2) determining the value of ANR with the manufacture of standard curve NO₂ (compound product) from the leaves of corn plants, green beans, sugar cane, uwi and chili, (3) learn Nitrate Reductase Activity (ANR) pepper plants were not cultivated, and fertilized with (NaNO₃): 0.1, 0.2 and 0.4, and (5) determining the value of ANR with the manufacture of standard curve NO₂ (compound product) from pepper plants were fertilized and not fertilized and the chilli plant organs. The tools used in the study of measurement ANR in vivo, the distribution of nitrate reductase and the physiologic effects of plants on the ANR is: a razor blade, the base to create a wedge, scales semi- analytic, tubes dark (movie), test tubes, micropipette, pipettes measure (5 ml), vortex and spectrophotometers. Materials used in the study in vivo measurement of ANR is a chili plant leaves, maize, uwi, sugarcane, green beans, 5M NaNO₃, NaNO₂ 0,6M, 0.1 pH 7.5 phosphate buffers; 0.02 % NED (Naphthyediamine), 1 % SA (sulfanilamide) in 3N HCl and distilled water. Materials used to study the distribution of nitrate reductase and plant physiological effect to ANR is the chili plants before flowering, during flowering and fruiting moment, while khemikalia ANR together with lab measurements in vivo. The results showed that: (1) The pepper plant is a plant that has activity Nitrate Reductase highest among five tested plants, while the plants uwi have nitrate reductase activity low, (2) long incubation can reduce the activity of Nitrate Reductase from five plant species tested, (3) based on the organs of plants, the highest measurements on leaves, based on the plant age measurements the ANR highest at seedling, (4) based on the leaf position, the ANR measurment of highest at section near the base, and (5) based on fertilization of NaNO₃, the ANR measurement of highest at a concentration of 0.2 M.

Keywords : *analysis, Nitrate Reductase, in vivo, plants*

PENDAHULUAN

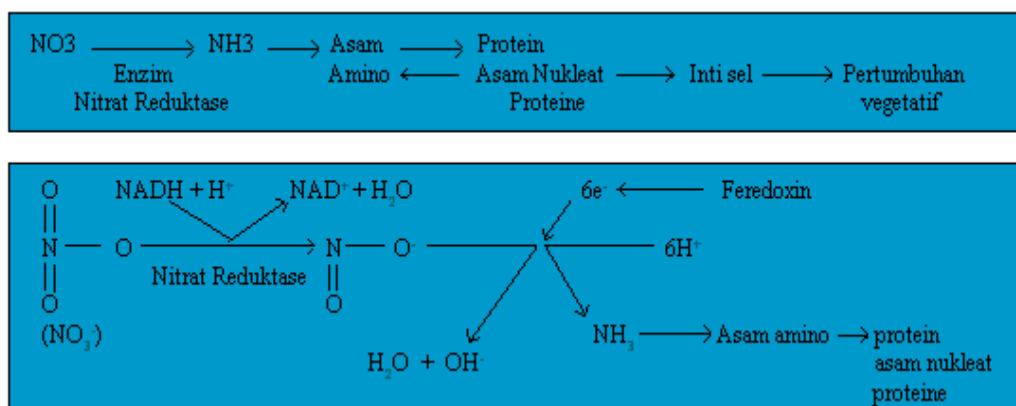
Nitrat Reduktase (NR) merupakan enzim yang mengkatalis nitrat menjadi nitrit dan bersifat *inducible* karena aktivitasnya dapat ditingkatkan dengan penambahan substrat. Tumbuhan memperoleh nitrogen dengan cara menyerap nitrat atau ion amonia yang ada dalam tanah, penyerapan kedua senyawa ion tersebut digunakan untuk membentuk berbagai senyawa nitrogen misalnya protein (Salisbury & Roos, 1995).

Aktivitas Nitrat Reduktase dapat ditentukan dengan mengukur absorbansinya yaitu dengan menggunakan spektrofotometri. Menurut Loveless (1990) aktivitas enzim Nitrat Reduktase pada daun tanaman dewasa berhubungan dengan hasil tanaman, sehingga tingkat aktivitas enzim Nitrat Reduktase dapat digunakan sebagai kriteria seleksi untuk memilih genotip dari suatu tanaman yang berdaya hasil tinggi. Enzim Nitrat Reduktase berguna untuk merubah nitrat menjadi nitrit yang kemudian setelah melalui serangkaian kerja enzim lain nitrit ini akan diubah menjadi asam amino. Alnopri (1995) menambahkan bahwa ANR banyak digunakan sebagai kriteria seleksi tanaman pada program pemuliaan tanaman. Pendekatan berdasarkan ANR sebagai kriteria seleksi dapat dipertimbangkan, karena enzim

yang dikendalikan oleh gen yang secara langsung terlibat dalam proses biosintesis protein. NR merupakan enzim pertama yang berperan dalam mereduksi nitrat menjadi amonia.

Untuk langkah reduksi nitrat menjadi nitrit oleh Nitrat Reduktase yang terjadi di daun dan akar diperlukan pemindahan dua elektron. Menurut Bonner (1965) energi pereduksi pada asimilasi nitrat berasal dari fotosintesis dan respirasi. Reduksi nitrat akan menghasilkan amonium yang segera bergabung dengan rangka karbon untuk membentuk senyawa nitrogen organ.

Pada pH rendah tanaman akan menyerap unsur N dalam bentuk ion NO_3^- . Ion NO_3^- ini kemudian dirubah oleh enzim Nitrat Reduktase menjadi NH_3 yaitu prekursor dalam pembentukan asam amino yang selanjutnya membentuk protein dan asam nukleat serta proteine (vitamin dan enzim) untuk pembentukan inti sel dari pembelahan sel sehingga pertumbuhan vegetatif menjadi sempurna.



Gambar 1. Skema aktivitas enzim Nitrat Reduktase

Berdasarkan skema di atas bahwa enzim Nitrat Reduktase begitu penting karena pembentukan NO_3^- menjadi NH_3 hanya ditentukan oleh kerja enzim Nitrat Reduktase (cuma satu jalur dan tidak bolak balik). Dari kerja enzim inilah terbentuk NH_3 yang selanjutnya menentukan pembentukan protein dan asam nukleat sebagai senyawa-senyawa yang menentukan kehidupan. Dalam mekanisme kerja enzim Nitrat Reduktase, ion NO_3^- direduksi menjadi ion NH_3 . Pada reaksi ini yang direduksi atau dikurangi adalah valensi dari NO_3^- (N valensi 5) menjadi NH_3 (N valensi 3).

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian pengukuran ANR secara *in vivo*, distribusi Nitrat Reduktase dan pengaruh fisiologis tanaman terhadap ANR adalah: pisau silet, alas untuk membuat irisan, timbangan semi analitik, tabung gelap (film), tabung reaksi, mikropipet, pipet ukur (5 ml), vortex dan spektrofotometer.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian pengukuran ANR secara *in vivo* adalah daun tanaman cabai, jagung, uwi, tebu, kacang hijau, 5M NaNO_3 , 0,6M NaNO_2 , 0,1 Bufer fosfat pH 7,5; 0,02% NED (Naphthyediamine), 1% SA (Sulfanilamide) dalam 3N HCl dan akuades. Bahan yang digunakan untuk penelitian distribusi Nitrat Reduktase dan pengaruh fisiologis tanaman terhadap ANR adalah Tanaman cabai sebelum berbunga, saat berbunga dan saat berbuah, sedangkan khemikalia sama dengan penelitian pengukuran ANR secara *in vivo*.

Cara Kerja

1. Pengukuran ANR *in vivo*

Pertama-tama diambil daun ke 2 dan ke 3 pada masing-masing jenis tanaman (jagung, kacang hijau, tebu, uwi dan cabai) dari debu atau air yang menempel dan dibuang tulang daunnya. Masing-masing jenis tanaman dilakukan 5 kali ulangan pengukuran. Daun tanaman ditimbang sebanyak 0,5 gram dan diiris kurang lebih setebal 2 mm. Kemudian irisan daun tersebut dimasukkan ke dalam tabung film yang telah berisi 5 ml bufer fosfat pH 7,5 dan direndam selama 20 menit.

Setelah direndam selama 20 menit, bufer fosfat yang digunakan untuk merendam irisan daun dibuang dan diganti dengan 5 ml bufer yang sama. Selanjutnya ditambahkan ke dalam tabung substrat enzim berupa 100 μ l larutan 5M NaNO_3 (konsentrasi akhir 0,1 M) dan diinkubasi selama 20, 30 dan 60 menit. Selama waktu inkubasi, disiapkan tabung reaksi yang berisi 200 μ l larutan 0,02% NED dan 200 μ l larutan 1% SA dalam 3N HCl. Setelah selesai waktu inkubasi, diambil 100 μ l aliquot hasil rendaman irisan daun dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan NED dan SA. Setelah 10 menit ditambahkan dalam tabung reaksi tersebut 2,5 ml akuades dan campuran larutan tersebut divorteks. Setelah campuran larutan divorteks, selanjutnya diukur dan dicatat nilai absorbansi dari campuran tersebut dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Tetapi sebelumnya dibuat campuran blanko sebagai faktor koreksi nilai absorbansi sampel.

2. Pembuatan Kurva Standar NO_2 (nitrit)

Pertama-tama dibuat 10 ml larutan NO_2 (BM = 46) dengan konsentrasi 4 nmol/100 μ l atau setara dengan larutan NaNO_3 (BM = 69) dengan konsentrasi 6 nmol/100 μ l atau 60 nmol/1000 μ l = 60 μ M. Disiapkan 8 tabung reaksi dan di setiap tabung tersebut masing-masing seperti pada tabel 1. Selanjutnya dihitung nilai absorbansi untuk masing-masing konsentrasi nitrit dan dibuat grafik hubungan antara konsentrasi nitrit dengan nilai absorbansinya serta dibuat persamaan linearnya.

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

3. Mengukur ANR pada Daun dari Tanaman yang Tidak dan Diberi Pupuk NaNO_3 : 0,1; 0,2 dan 0,4 M.

Tanaman cabai yang masih muda direndam dalam pupuk NaNO_3 dengan konsentrasi 0,1; 0,2 dan 0,4 M dan tanpa dipupuk. Setelah direndam beberapa lama, diperkirakan pupuk sudah terserap oleh tanaman cabai, selanjutnya daun tanaman tersebut diukur Aktivitas Nitrat Reduktase-nya menggunakan prosedur penelitian sebelumnya (pengukuran ANR secara *in vivo*).

4. Mengukur ANR Tanaman Cabai pada bagian Akar, Batang, Daun dan Buah.

Tanaman cabai diambil dan diuji aktivitas Nitrat Reduktase-nya pada bagian akar, Batang, Daun dan Buah. Prosedur uji Aktivitas Nitrat Reduktase menggunakan metode pada penelitian sebelumnya.

5. Mengukur ANR Tanaman Cabai pada Daun Pucuk, Daun Tengah (Setelah Pucuk), Daun Tengah (Sebelum Pucuk) dan Daun Pangkal

Tanaman cabai diambil daun pucuk, daun tengah (setelah pucuk), daun tengah (sebelum pucuk) dan daun pangkal. Kemudian diuji aktivitas Nitrat Reduktase-nya menggunakan metode penelitian sebelumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil

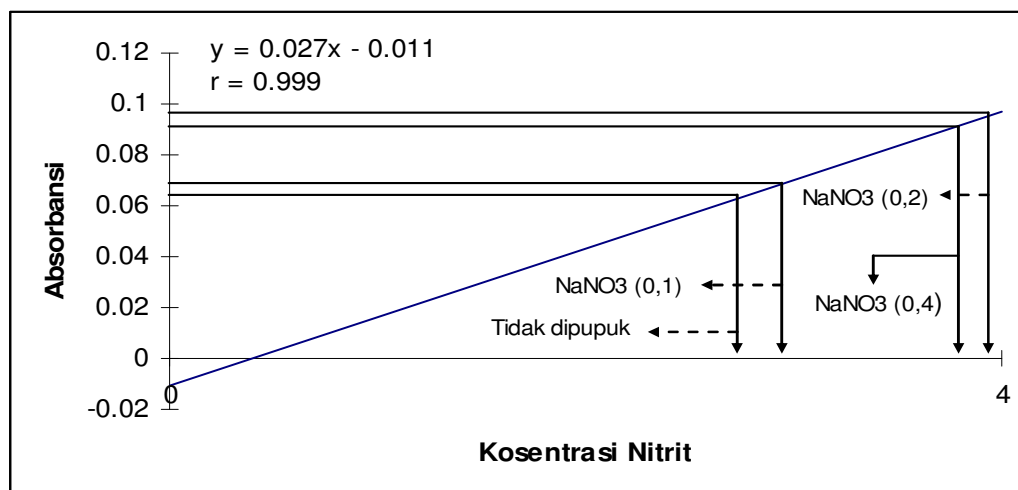
Tabel 2. Nilai Absorbansi (540 nm) ANR dan Konsentrasi Nitrit Daun Tanaman Berbeda Jenis

Waktu Inkubasi (menit)	Jagung		Kacang Hijau		Tebu		Uwi		Cabe	
	Absor.	[nitrit]	Absor.	[nitrit]	Absor.	[nitrit]	Absor.	[nitrit]	Absor.	[nitrit]
20	0.096*	4.091	0.074	3.130	0.097	4.015	0.077	3.275	0.179*	7.882
30	0.080	3.370	0.076	3.222			0.073	3.104	0.247*	10.964
60	0.086	3.593	0.075	3.170			0.072	3.089	0.455	17.267

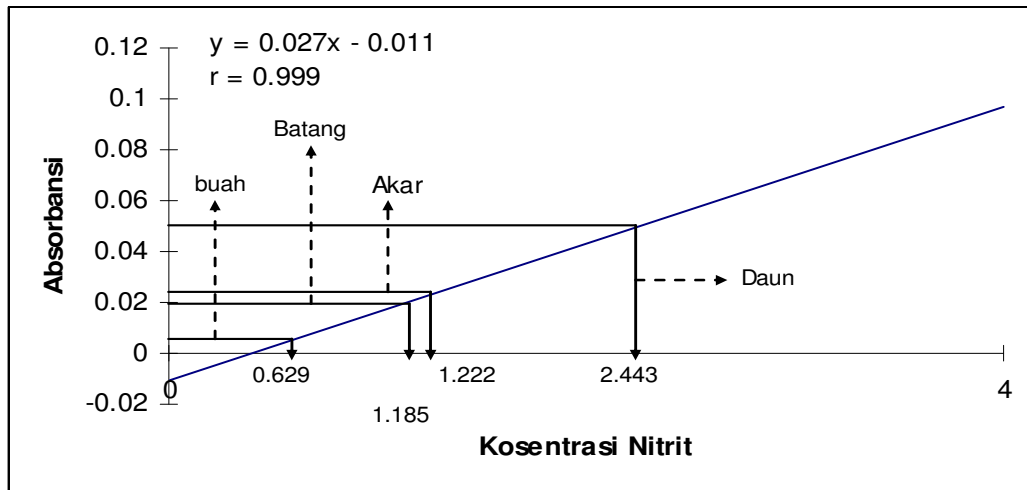
Keterangan : (*) = menggunakan spektrofotometer UV
() = menggunakan spektronik 21D

Tabel 3. Nilai absorbansi aktivitas Nitrat Reduktase pada daun tanaman

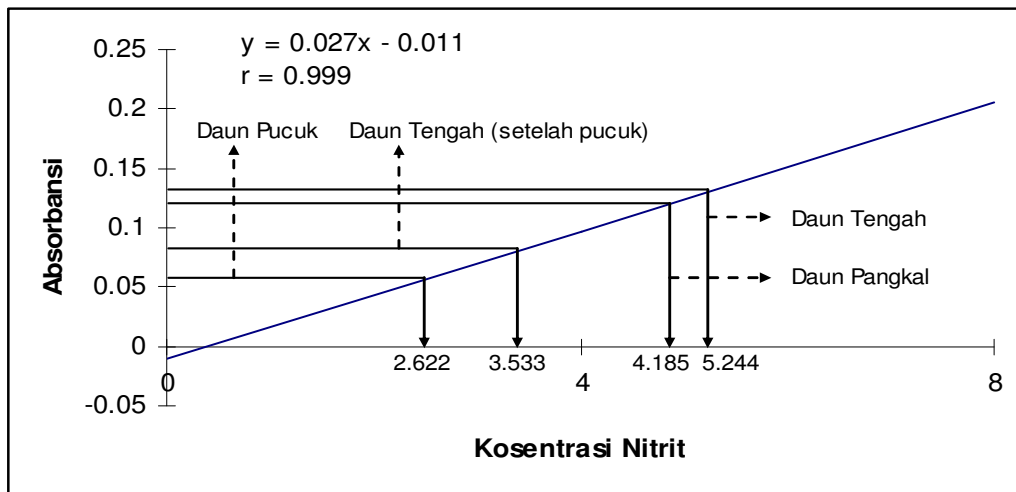
Jenis tanaman/waktu inkubasi	Rata-rata Absorbansi	Kadar Nitrit	ANR	
Jagung	20'	0,097	$5,182 \times 10^{-3}$	1,5546
	30'	0,08	$3,5 \times 10^{-3}$	0,7
	60'	0,0858	$3,723 \times 10^{-3}$	0,3723
Kacang hijau	20'	0,0735	$3,25 \times 10^{-3}$	1,21875
	30'	0,076	$3,346 \times 10^{-3}$	0,8365
	60'	0,0726	$3,215 \times 10^{-3}$	0,401875
Tebu	20'	0,0974	$5,2 \times 10^{-3}$	1,56
	30'	-	-	-
	60'	-	-	-
Uwi	20'	0,0774	$3,4 \times 10^{-3}$	1,02
	30'	0,0728	$3,223 \times 10^{-3}$	0,6446
	60'	0,0724	$3,208 \times 10^{-3}$	0,3208
Cabai	20'	0,1794	$8,927 \times 10^{-3}$	2,6781
	30'	0,2472	0,012	2,4
	60'	0,4552	0,0179	1,79



Gambar 2. Grafik Nilai Absorbansi (540 nm) dan Kosentrasi Nitrit Pada Perlakuan Tanaman Cabe tidak dipupuk, Dipupuk NaNO3: 0.1, 0.2 dan 0.4



Gambar 3. Grafik Nilai Absorbansi (540 nm) dan Kosentrasi Nitrit Pada Akar, Batang, Daun dan Buah Tanaman Cabe



Gambar 4. Grafik Nilai Absorbansi (540 nm) dan Kosentrasi Nitrit Pada Daun Pucuk, Daun Tengah (Setelah Pucuk), Daun Tengah dan Daun Pangkal Tanaman Cabe.

Tabel 4. Nilai Absorbansi (540 nm) dan Kosentrasi Nitrit pada perlakuan Pemupukan, Bagian Tanaman Cabai dan Kedudukan Daun Tanaman Cabai

Perlakuan	0		0,1		0,2		0,4	
	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]
Pemupukan	0,0672	2,8963	0,0676	2,9111	0,0904	3,7556	0,086	3,5926
Bagian Tanaman	Akar		Batang		Daun		Buah	
	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]
	0,0220	1,2222	0,0210	1,1852	0,0550	2,4426	0,0066	0,62963
Kedudukan Daun	Daun Pucuk		Daun Tengah (Setelah Pucuk)		Daun Tengah (Sebelum Pucuk)		Daun Pangkal	
	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]	Absorb.	[Nitrit]
	0,0598	2,6222	0,0844	3,5333	0,1306	5,2444	0,1020	4,1851

Tabel 5. ANR pada berbagai organ tanaman cabai (Inkubasi 30 menit)

Organ tanaman	Rata-rata Absorbansi	Kadar NO ₂ (µmol)	ANR
Akar	0,0264	1,438 x 10 ⁻³	0,2876
Batang	0,0306	1,6 x 10 ⁻³	0,32
Daun	0,098	4,192 x 10 ⁻³	0,8384
Buah	0,0098	8 x 10 ⁻⁴	0,16

Tabel 6. ANR pada berbagai organ tanaman cabai (Inkubasi 70 menit)

Organ tanaman	Rata-rata Absorbansi	Kadar NO ₂ - (µmol)	ANR
Akar	0,0176	1,1 x 10 ⁻³	0,0946
Batang	0,0122	8,923 x 10 ⁻⁴	0,0767
Daun	0,1482	6,123 x 10 ⁻³	0,5266
Buah	0,0034	5,538 x 10 ⁻⁴	0,04763

Tabel 7. ANR berdasarkan umur tanaman bibit, dewasa sebelum berbunga, dewasa berbunga, dewasa berbuah (inkubasi 40 menit)

Umur tanaman	Rata-rata Absorbansi	Kadar NO ₂ - (µmol)	ANR
Bibit	0,0448	2,146 x 10 ⁻³	0,3219
Dewasa sebelum berbunga	0,0378	1,877 x 10 ⁻³	0,28155
Dewasa berbunga	0,0186	1,138 x 10 ⁻³	0,1707
Dewasa berbuah	0,0402	1,969 x 10 ⁻³	0,29535

Tabel 8. ANR berdasarkan posisi ujung daun, dekat ujung, dekat pangkal, pangkal batang (inkubasi 50 menit)

Posisi Daun	Rata-rata Absorbansi	Kadar NO ₂ - (µmol)	ANR
Ujung daun	0,0598	2,723 x 10 ⁻³	0,32676
Dekat ujung	0,0844	3,669 x 10 ⁻³	0,44028
Dekat pangkal	0,1306	5,446 x 10 ⁻³	0,65352
Pangkal batang	0,102	4,346 x 10 ⁻³	0,52152

Tabel 9. ANR tanaman cabai yang dipupuk NaNO₃ (inkubasi 60 menit)

Konsentrasi Pupuk (M)	Rata-rata Absorbansi	Kadar NO ₂ - (µmol)	ANR
0	0,0668	2,992 x 10 ⁻³	0,2992
0,1	0,0676	3,023 x 10 ⁻³	0,3023
0,2	0,0904	3,9 x 10 ⁻³	0,39
0,4	0,0868	3,761 x 10 ⁻³	0,3761

2. Pembahasan

Berdasarkan Hasil percobaan menunjukkan bahwa tanaman cabai mempunyai Aktivitas Nitrat Reduktase (gambar 1) yang tinggi dibandingkan dengan keempat jenis tanaman yang lain (jagung, kacang hijau, uwi dan tebu). Hal ini ditunjukkan dengan nilai Aktivitas Nitrat Reduktase sebesar 2,6781 pada inkubasi selama 20 menit, sedangkan Aktivitas Nitrat Reduktase terendah diperoleh pada tanaman uwi dengan nilai 0,3208 pada inkubasi 60 menit. Pada kelima jenis tanaman menunjukkan bahwa terjadi kecenderungan penurunan aktivitas Nitrat Reduktase sejalan dengan semakin lamanya inkubasi.

Berdasarkan kurva standar menunjukkan bahwa ada korelasi positif sebesar 0.999 jika menggunakan alat spektrometri UV, dan korelasi positif nyata sebesar 0.996 dengan menggunakan spektrofotometer UV. Hal ini menunjukkan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi nitrit diikuti oleh peningkatan nilai absorbansinya. Pada kelima jenis tanaman yang diuji, perlakuan inkubasi selama 20 menit, 30 menit dan 60 menit menunjukkan hasil konsentrasi nitrit yang lebih tinggi sejalan dengan semakin lama waktu inkubasi, kecuali pada tanaman uwi dan kacang hijau. Dimana tanaman uwi semakin lama waktu inkubasi dapat menurunkan konsentrasi nitrit yang dihasilkan oleh enzim. Sedangkan pada kacang hijau inkubasi selama 60 menit dapat menurunkan konsentrasi nitrit, tetapi pada inkubasi selama 30 menit dapat meningkatkan konsentrasi nitrit dibandingkan waktu inkubasi selama 20 menit (tabel 2). Menurut Anonim (2009), bahwa Aktivitas Nitrat Reduktase dapat diinduksi oleh substratnya yaitu NO₃ dan diinhibisi oleh produknya (NO₂). Pada konsentrasi nitrit 3,275 nmol (inkubasi 20 menit) Aktivitas Nitrat Reduktase pada tanaman uwi terhambat

aktivitasnya, sedangkan pada tanaman kacang hijau aktivitas Nitrat Reduktase dapat terhambat aktivitasnya pada konsentrasi nitrit sebesar 3,222 nmol. Sedangkan pada tanaman cabai dan tanaman jagung inkubasi selama 60 menit belum menghambat Aktivitas Nitrat Reduktase.

Tabel 10. Prosentase Penyimpangan Hasil Pengukuran pada Kelima Jenis Tanaman

Waktu Inkubasi (menit)	Jagung		Kacang Hijau		Tebu		Uwi		Cabe	
	rata2	rentang	rata2	rentang	rata2	rentang	rata2	rentang	rata2	rentang
20	0.096	0.036	0.074	0.012	0.097	0.031	0.077	0.007	0.179	0.048
%	37.5%		16.2%		32%		9.1%		26.8%	
30	0.080	0.012	0.076	0.008			0.073	0.015	0.2477	0.117
%	15%		10.5%				20.5%		47.2%	
60	0.86	0.009	0.075	0.013			0.072	0.009	0.455	0.167
%	1.04%		17.3%				12.5%		36.6%	

Keterangan : (*) = menggunakan spektrofotometer UV
() = menggunakan spektroskopik 21D

Pengukuran ANR pada organ tanaman yang berbeda (Tabel 5 dan Tabel 6) baik pada inkubasi 30 menit dan 70 menit, ANR yang tertinggi pada organ daun yaitu 0,8384 (inkubasi 30 menit) dan 0,5266 (inkubasi 70 menit). Penyebaran NR hampir dalam seluruh bagian tanaman, akan tetapi umumnya paling banyak pada daun, yaitu di dalam sitoplasma, organel, dan membran plasma. Menurut Bray (1983) NR sebagian terdapat dalam sitosol akar maupun daun dan merupakan enzim kompleks yang mempunyai berat molekul yang tinggi (sampai 500.000). Kebanyakan unsur hara nitrat yang diabsorpsi oleh akar tanaman yang tumbuh aktif dengan cepat akan ditranslokasikan ke daun melalui jaringan pengangkut xilem.

Aktivitas Nitrat Reduktase berdasarkan posisi daun (Tabel 7), ANR yang tertinggi pada daun dekat pangkal yaitu sebesar 0,65352. Pada perlakuan pemupukan NaNO_3 (Tabel 6), ANR yang tertinggi pada konsentrasi pemupukan 0,2 M. Aktivitas dan jumlah Nitrat Reduktase dikendalikan melalui produksi enzim baru dan mekanisme perombakan enzimserta proses inaktivasi/reaktivasi enzim. Produksi NR diinduksi oleh nitrat (Kaiser & Brendle-Behnisch, 1991) sehingga ANR dapat menjadi indikasi ketersediaan unsur hara N didalam tubuh tanaman.

Di antara banyak enzim tanaman, NR telah banyak diketahui hubungannya dengan hasil tanaman. NR merupakan enzim yang dapat ditingkatkan dengan penambahan substrat nitrat (Salisbury dan Roos, 1995). Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas NR adalah pemupukan nitrogen. Kekurangan nitrogen akan membatasi serapan nitrat dari larutan tanah, sehingga akan menurunkan aktivitas NR daun yang berarti akan menurunkan produksi. Produktivitas suatu tanaman berhubungan dengan penyerapan nitrogen yang akan berpengaruh terhadap aktivitas NR.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa:

1. Tanaman cabai merupakan tanaman yang mempunyai Aktivitas Nitrat Reduktase tertinggi diantara lima tanaman yang diuji, sedangkan tanaman uwi mempunyai aktivitas Nitrat Reduktase terendah.
2. Lama inkubasi dapat menurunkan aktivitas Nitrat Reduktase dari kelima jenis tanaman yang diuji.
3. Validitas hasil penelitian kurang begitu baik, hal ini disebabkan kesalahan metodik, pengoperasian dan peralatan.
4. Berdasarkan organ tanaman pengukuran ANR tertinggi pada daun, berdasarkan umur tanaman pengukuran ANR tertinggi pada bibit.

5. Berdasarkan posisi daun pengukuran ANR tertinggi pada bagian dekat pangkal.
6. Berdasarkan pemupukan NaNO_3 pengukuran ANR tertinggi pada konsentrasi 0,2 M.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2009. Asistensi dan Petunjuk Penelitian : Biokimia Analitik. Laboratorium Biokimia. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Bonner, J and J.E. Vamer, 1965. Plant biochemistry. Academic Press. New York and London. pp. 477-488.
- Bray, C.N. 1993. Nitrogen metabolism in plants. Longman inc. New York. pp. 22-28.
- Loveless, A. R. 1991. Prinsip-Prinsip Biologi Tumbuhan Untuk Daerah Tropik. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Muller, W.H. 1978. Botany : Functional approach fourth edition. Coller Macmillan. Pub. London. 687 p.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1995. Fisiologi Tumbuhan. Jilid 3. Terjemahan Diah R. Lukman dan Sumaryono. ITB. Bandung.