



**RESPON AKTIVITAS ENZIM NITRAT REDUKTASE
DAUN KEDELAI (*Glycine max.* L. Merr) FASE
VEGETATIF (V2) TERHADAP PEMBERIAN
NITRAT DALAM KONDISI
CEKAMAN GARAM**

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

**Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat untuk
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian
Universitas Jember**

Oleh

**Niken Prahastuti
NIM : 981510101040**

**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS PERTANIAN**

Nopember, 2003

Asal:	Hadiah Pembelian	Klass 633.34 PRA A C1	KEDELAI - PEMUPUKATAN NITROGEN
Terima tgl:	17 APR 2004		
o. Indu:			

KARYA TULIS ILMIAH BERJUDUL

**RESPON AKTIVITAS ENZIM NITRAT REDUKTASE DAUN KEDELAI
(Glycine max. L.Merr) FASE VEGETATIF (V2) TERHADAP
PEMBERIAN NITRAT DALAM KONDISI
CEKAMAN GARAM**

Dipersiapkan dan disusun oleh

Niken Prahastuti
NIM 981510101040

Telah diuji pada tanggal
18 Nopember 2003

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

TIM PENGUJI

Ketua,


Ir. Miswar, Msi
NIP 131 880 473

Anggota I


Ir. Denna Eriani, MP
NIP. 131 759 541

Anggota II


Dr. Ir. Kacung Harivono, MS
NIP. 132 135 201



MENGESAHKAN
Dekan,

Ir. Sri Indijahjati, MS
NIP. 130 609 808

KARYA TULIS ILMIAH

**RESPON AKTIVITAS ENZIM NITRAT REDUKTASE DAUN KEDELAI
(*Glycine max.* L. Merr) FASE VEGETATIF (V2) TERHADAP
PEMBERIAN GARAM DALAM KONDISI
CEKAMAN GARAM**

Oleh:

Niken Prahastuti
981510101040

Dipersiapkan dan disusun di bawah bimbingan :

Dosen Pembimbing Utama (DPU) : Ir. Miswar, Msi

Dosen Pembimbing Anggota (DPA) : Ir. Denna Eriani M, MP



Terimakasihku pada:

- Allah SWT atas karunia dan ridho-Nya
- Ibu Erina Hasniah dan Bapak Pramudyanto S.IP atas kasih sayang, doa yang tiada putus dan dukungan serta semangat untuk keberhasilan nanda
- Adikku Ermita Arumsari atas keceriaan sepanjang masa
- Mas Yusuf, seluruh kesabaran dan perhatianmu membuat segalanya begitu berarti

*Dream, what you want to dream
Go, where you want to go
Be, what you want to be
You have only one life
And one chance
To do all the things you want to do
(October)*

*A mother love is like a circle
It has no beginning and no ending
It keeps going around and around ever
Expanding, touching everyone
And covering them like
A blanket of evening stars
(December)*

*Many people will walk in and out
Of your life
But only true friends will leave footprints
In your heart and bring a bar of love
(March)*

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahNya, sehingga karya ilmiah tertulis (skripsi) berjudul “Aktivitas Enzim Nitrat Reduktase Tanaman Kedelai (*Glycine max.L.Merr*) Fase Vegetatif (V2) terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam” ini dapat terselesaikan. Penelitian ini didasarkan pada beberapa kemungkinan yang dapat dilakukan dalam memanfaatkan lahan marginal untuk dimanfaatkan sebagai lahan penanaman kedelai terutama dalam penggunaan unsur nitrogen.

Skripsi ini disusun untuk menyelesaikan pendidikan strata satu pada Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember, sejak Pebruari – Nopember 2003.

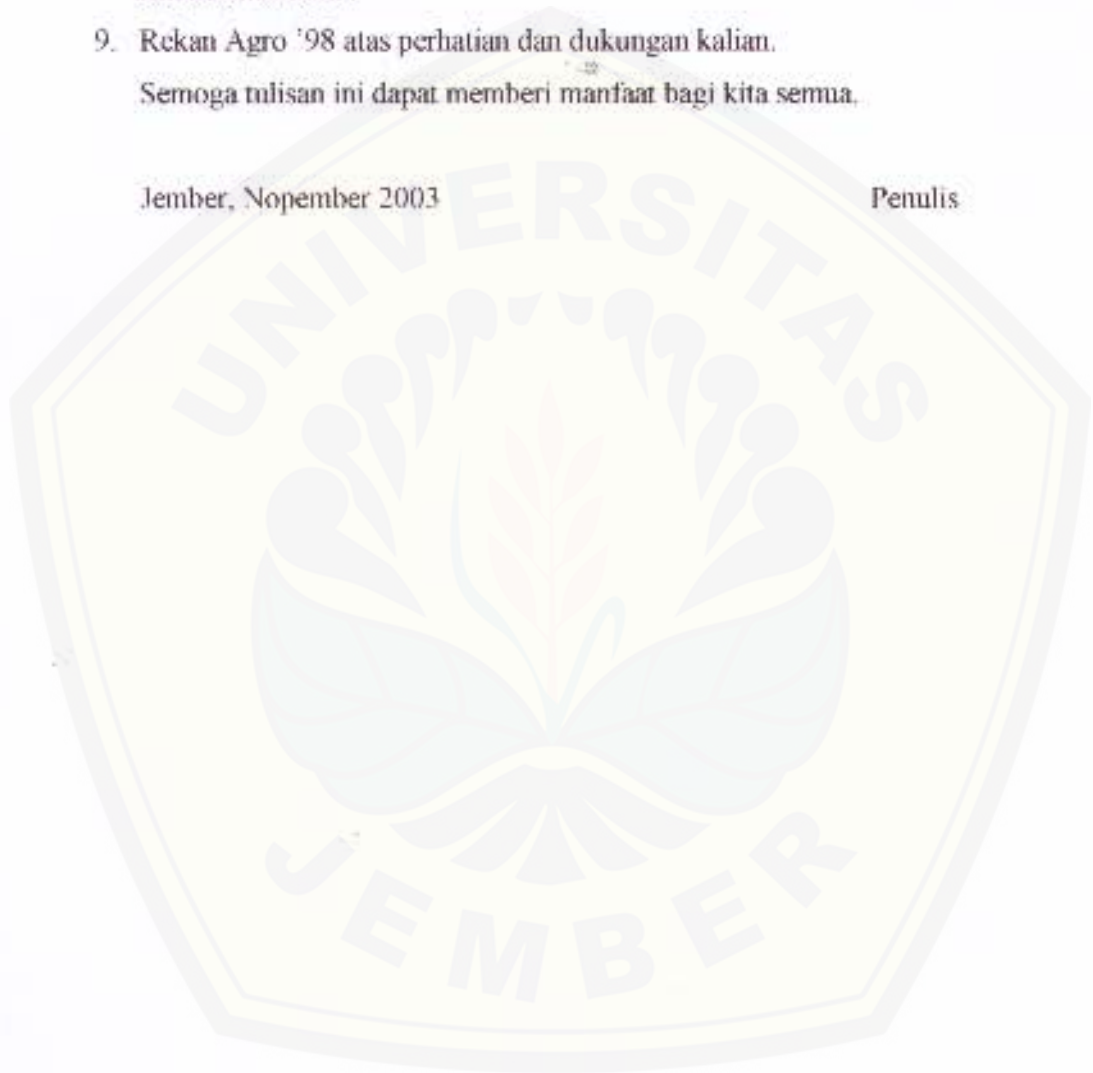
Ucapan terimakasih sebesar-besarnya kepada :

1. Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember
2. Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember
3. Ir. Miswar, Msi selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) atas bimbingan dalam analisis di laboratorium maupun dalam penyusunan skripsi, saran dan motivasi serta pinjaman pustaka yang mendukung kelancaran penulisan Karya Ilmiah ini.
4. Ir. Denna Eriani M, MP selaku Dosen Pembimbing Anggota atas bimbingan dalam penyusunan skripsi serta saran demi kesempurnaan skripsi ini.
5. Dr. Ir. Kacung Hariyono, MS selaku Tim Penguji Anggota II yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran untuk sempurnanya karya tulis ilmiah ini.
6. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MSc selaku Ketua Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk mengadakan penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler.

7. Seluruh teman – teman seperjuangan di Lab. Biomol yang setia menolong dan memberikan masukan (Khristin, Fafan, Trina, Ima, Ika, Nourma, Iswadi, Sudi dan yang lain)
8. Teman – teman PKL (Ani, Dyah, Lilik, Shanti dan Bandi) atas dukungan dan semangat serta doa yang tak pernah putus. Terimakasih atas indahnya kebersamaan kita.
9. Rekan Agro '98 atas perhatian dan dukungan kalian.
Semoga tulisan ini dapat memberi manfaat bagi kita semua.

Jember, Nopember 2003

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR SINGKATAN	xii
RINGKASAN	xiii
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Intisari Permasalahan.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Umum Tanaman Kedelai.....	4
2.2 Asimilasi Nitrogen dan Peranan Enzim Nitrat reduktase bagi Tanaman.....	5
2.3 Pengaruh Salinitas Terhadap Metabolisme dan Pertumbuhan Tanaman Kedelai.....	6
2.4 Hipotesis.....	8
III. BAHAN DAN METODE	
3.1 Bahan dan Alat.....	9
3.2 Pelaksanaan Penelitian	
3.2.1 Perlakuan Penelitian.....	9
3.2.2 Penanaman.....	10
3.2.3 Pemberian NaCl dan Larutan Hara.....	10
3.2.4 Pemeliharaan.....	10
3.2.5 Pemanenan.....	10

3.3 Analisis laboratorium	
3.3.1 Ekstraksi Enzim	11
3.3.2 Pengujian Aktivitas Enzim NR	11
3.3.3 Penentuan Kandungan Protein Terlarut	11
3.3.4 Ekstraksi Nitrat Jaringan Tanaman	12
3.3.5 Penentuan Kandungan Nitrat Jaringan	12
3.3.6 Penentuan Kandungan Nitrit Jaringan	12
3.3.7 Penentuan Aktivitas Enzim SS	12
3.3.8 Penentuan Aktivitas Enzim NI	13
3.3.9 Penentuan Kandungan Gula Reduksi	13
3.3.10 Penentuan Kandungan Sukrosa	14
3.4 Parameter Pengamatan	14

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pengamatan	
4.1.1 Aktivitas Spesifik Enzim NR	15
4.1.2 Kandungan TPT	16
4.1.3 Kandungan Nitrat Jaringan	18
4.1.4 Kandungan Nitrit Jaringan	19
4.1.5 Kandungan Sukrosa Jaringan	20
4.1.6 Aktivitas Spesifik Enzim NI dan SS	22
4.1.7 Kandungan Gula Reduksi	24
4.2 Pembahasan	25

V. SIMPULAN

5.1 Simpulan	30
5.2 Saran	30

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR GAMBAR

No	Judul Gambar	Halaman
1.	Aktivitas Spesifik Enzim NR Daun Kedelai Fase Vegetatif Terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam.....	15
2.	Rerata Aktivitas Spesifik Enzim NR Daun Kedelai Fase Vegetatif dalam Kondisi Cekaman Garam.....	16
3.	Kandungan Total Protein Terlarut Daun Kedelai Fase Vegetatif Terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam.....	16
4.	Rerata Kandungan Total Protein Terlarut Daun Kedelai Fase Vegetatif dalam Kondisi Cekaman Garam.....	17
5.	Kandungan Nitrat Jaringan Daun Kedelai Fase Vegetatif Terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam.....	18
6.	Rerata Kandungan Nitrat Jaringan Daun Kedelai Fase Vegetatif dalam Kondisi Cekaman Garam.....	18
7.	Kandungan Nitrit Jaringan Daun Kedelai Fase Vegetatif Terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam.....	19
8.	Rerata Kandungan Nitrit Jaringan Daun Kedelai Fase Vegetatif dalam Kondisi Cekaman Garam.....	20
9.	Kandungan Sukrosa Jaringan Daun Kedelai Fase Vegetatif Terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam.....	20
10.	Rerata Kandungan Sukrosa Jaringan Daun Kedelai Fase Vegetatif dalam Kondisi Cekaman Garam.....	21

11. Aktivitas Spesifik Enzim NI Daun Kedelai Fase Vegetatif Terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam	22
12. Rerata Aktivitas Spesifik Enzim NI Daun Kedelai Fase Vegetatif dalam Kondisi Cekaman Garam	22
13. Aktivitas Spesifik Enzim SS Daun Kedelai Fase Vegetatif Terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam	23
14. Rerata Aktivitas Spesifik Enzim SS Daun Kedelai Fase Vegetatif dalam Kondisi Cekaman Garam	23
15. Kandungan Gula Reduksi Jaringan Daun Kedelai Fase Vegetatif Terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam	24
16. Rerata Kandungan Gula Reduksi Jaringan daun Kedelai Fase Vegetatif dalam Kondisi Cekaman Garam	24

DAFTAR SINGKATAN

NR	: Nitrat reduktase
SS	: Sucrose synthase
NI	: Neutral invertase
TPT	: Total Protein Terlarut
EDTA	: Ethylenediamine Tetra Acetic Acid
MOPs	: 3-(N-Morpholino) Propane Sulfonic Acid
PVP	: Polyvinil Pyrrolidone
β -ME	: β -mercaptoethanol
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
UDP	: Uridin Diphospho Glukosa
NADH	: Nicotinamide Adenin Dinucleotida
NED	: N-naphthylethylenediamine dichloride
DNA	: Dinitrosalicylic acid
BSA	: Bovine Serum Albumin
p.a	: pure analysis

Niken Prahastuti (981510101040). **Respon Aktivitas Enzim Nitrat Reduktase Daun Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.Merr) Fase Vegetatif (V2) terhadap Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam**, di bawah bimbingan Ir. Miswar, Msi selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) dan Ir. Denna Eriani Munandar, MP selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA).

RINGKASAN

Pertumbuhan tanaman sangat peka terhadap cekaman garam, sehingga hasil panen dapat menurun pada lahan yang mengalami cekaman garam. Sel menjadi lebih kecil dan daun kurang berkembang selama adanya cekaman, mengakibatkan berkurangnya luas daun untuk berfotosintesis. Terhambatnya fotosintesis akan berpengaruh terhadap pembentukan karbohidrat yang akan berpengaruh terhadap kemampuan tanaman legum dalam melakukan fiksasi N yang dibutuhkan untuk metabolisme nitrogen. Ketersediaan nitrogen dalam bentuk nitrat dapat meningkatkan aktivitas enzim. Pemberian nitrat diharapkan dapat menutupi kekurangan nitrogen akibat cekaman.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim Nitrat Reduktase saat pemberian nitrat pada kondisi cekaman garam selama masa vegetatifnya. Bahan tanam yang digunakan kedelai varietas Bromo yang ditanam pada pasir steril dengan kondisi normal (0mM NaCl) dan kondisi cekaman garam (60 mM NaCl) yang masing-masing diberi perlakuan nitrat dengan konsentrasi KNO_3 0; 2,5, 5 dan 7,5 mM KNO_3 setiap pagi dan sore hari sebanyak 200 ml sampai tanaman berumur 2 minggu (14 hari). Panen dilakukan setelah tanaman berumur 14 hari dengan mengambil daun trifoliat yang terbentuk sempurna.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa cekaman garam sampai konsentrasi 60 mM dapat menurunkan aktivitas enzim Nitrat Reduktase pada fase vegetatif sebesar 83,26%. Aktivitas enzim NR tertinggi didapatkan pada perlakuan NaCl setelah diberikan nitrat dengan konsentrasi 7,5 mM. Kondisi cekaman garam ternyata dapat menurunkan kandungan nitrat, nitrit dan sukrosa jaringan serta aktivitas enzim NI dan SS namun cekaman garam dapat meningkatkan kandungan total protein terlarut serta gula reduksi jaringan tanaman.



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) merupakan tanaman pangan yang mengandung protein dalam jumlah besar (Sexton, *et al.*, 1998), sehingga sangat diperlukan dalam mencukupi kebutuhan gizi manusia (masyarakat). Seiring dengan meningkatnya permintaan terhadap kedelai (*Glycine max* L.Merr), sebagai salah satu tanaman pangan dalam memenuhi kebutuhan gizi masyarakat maka perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut baik secara intensifikasi maupun ekstensifikasi. Peningkatan jumlah penduduk dapat mempengaruhi terhadap areal tanam tanaman kedelai sehingga terjadi penggeseran lahan ke areal yang tingkat kesuburan tanahnya rendah. Menyusutnya luas lahan subur karena digunakan untuk kegiatan nonpertanian mengakibatkan perlunya lahan alternatif untuk budidaya kedelai. Salah satu jenis lahan yang dimaksud adalah lahan pasang surut. Lahan pasang surut sulfat masam merupakan lahan potensial untuk pengembangan kedelai sebagai daerah baru walaupun jenis lahan ini dikategorikan sebagai lahan marjinal (Adisarwanto, 1999).

Beberapa tanah kehilangan produktivitasnya dikarenakan adanya akumulasi garam sehingga diperlukan air, energi dan kemampuan untuk memperbaiki sifat tanah dalam jumlah besar. Konsentrasi garam yang tinggi dapat menurunkan hasil panen, menurunkan tingkat kesuburan tanah dan menambah biaya pengadaan air serta biaya perbaikan drainase (Caines and Sherman, 1999).

Cekaman garam merupakan salah satu faktor pembatas utama bagi pertumbuhan dan produksi pada sebagian besar tanaman, terlebih apabila sumber nitrogen bergantung pada fiksasi N_2 oleh simbiosis (Abd-Alla, 1992). Cekaman garam dapat mengganggu jalannya fotosintesis karena faktor ketersediaan air akan terganggu. Kekurangan air karena adanya cekaman garam dapat menurunkan turgiditas sel penjaga stomata, sehingga stomata akan menutup. Penutupan stomata ini akan menghambat difusi CO_2 yang dibutuhkan untuk sintesis karbohidrat (Lakitan, 1995).

Cekaman garam memacu akumulasi dari ammonium, nitrat dan asam amino bebas di tanaman dan cenderung akan menekan aktivitas enzim yang terlibat di dalam asimilasi amonium (Soussi *et al.*, 1997). Penurunan aktivitas NR karena cekaman garam juga sangat dipengaruhi oleh fotosintesis, hal ini disebabkan karena sukrosa sebagai hasil fotosintesis akan menginduksi aktivitas NR pada daerah akar (Srivashar *et al.*, 1997). Karbohidrat (sukrosa) hasil fotosintesis tanaman inang (kedelai) yang ditransportasikan ke akar melalui floem tidak dapat digunakan secara langsung sebagai sumber karbon atau energi untuk proses metabolisme nitrogen, tetapi harus dipecah terlebih dahulu. Terdapat dua enzim yang berperan dalam pemecahan sukrosa, yaitu Sucrose synthase (SS) dan Invertase (Inv). Cekaman garam secara nyata dapat menurunkan aktivitas SS nodul, yang secara langsung juga berhubungan dengan penurunan fiksasi N_2 oleh nodul (Gordon *et al.*, 1997).

Terganggunya proses fotosintesis berpengaruh terhadap kemampuan tanaman melakukan fiksasi nitrogen dari udara. Fotosintesis yang terhambat karena cekaman garam menyebabkan jumlah karbohidrat yang terbentuk menurun dan menyebabkan metabolisme nitrogen terganggu sehingga mempengaruhi aktivitas enzim. Enzim yang berperan dalam metabolisme N adalah enzim Nitrat Reduktase. Unsur Nitrogen memiliki pengaruh yang kuat terhadap pertumbuhan dan proses perkembangan tanaman. Nitrogen yang diserap dalam bentuk amonium dan nitrat, dan akan mengalami perubahan dimana nitrogen akan menjadi amonia dengan melibatkan dua enzim dan reaksi yang berbeda. Salah satu enzim pokok dalam metabolisme nitrogen dalam bentuk nitrat adalah enzim Nitrat Reduktase. Menurunnya aktivitas enzim NR tersebut akan mempengaruhi ketersediaan protein, asam amino, asam nukleat dan senyawa esensial lainnya.

1.2 Intisari Permasalahan

Umumnya nitrogen diserap tanaman dalam bentuk amonium (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-). Tumbuh-tumbuhan yang tidak melakukan fiksasi N_2 secara langsung dari udara mendapatkan sebagian besar nitrogennya dari dalam tanah dalam bentuk nitrat. Penyerapan nitrogen berjalan dengan baik apabila keadaan

lingkungan tumbuh tidak mengalami gangguan seperti kekeringan maupun cekaman garam.

Cekaman garam atau salinitas dapat mengakibatkan tekanan osmotik tumbuhan menurun, menghambat penyebaran rambut-rambut akar tanaman, menurunkan jumlah dan fungsi nodul akar sehingga fiksasi N_2 simbiotik menjadi terhambat. Menurunnya kemampuan tanaman untuk memfiksasi N_2 melalui simbiotik dapat menurunkan suplai nitrogen yang dibutuhkan tanaman, sehingga mempengaruhi metabolisme tanaman dalam proses pertumbuhannya. Adanya pemberian nitrat, maka tanaman akan mendapatkan suplai nitrogen yang tidak dapat dipenuhi tanaman melalui fiksasi N_2 karena tanaman mengalami cekaman garam. Pemberian nitrat sebagai sumber nitrogen pada tanaman menyebabkan tanaman mengakumulasi sejumlah nitrat, baik pada daun maupun akarnya sehingga aktivitas NR menjadi lebih besar (Sugiharto, 1996). Aktivitas enzim Nitrat Reduktase merupakan salah satu proses yang dapat dipengaruhi oleh ketersediaan nitrat, karena enzim NR merupakan enzim yang mengkatalisis reduksi nitrat menjadi nitrit.

Berkurangnya suplai nitrogen dalam jaringan akibat cekaman garam dapat diatasi dengan pemberian nitrat dari luar, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim NR pada fase vegetatif terhadap penambahan nitrat pada kondisi tercekam garam.

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui aktivitas enzim Nitrat Reduktase tanaman kedelai terhadap pemberian Nitrat saat tercekam garam pada fase vegetatif (V2).

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang aktivitas enzim NR dengan pemberian nitrat pada kondisi cekaman garam dan menjadi salah satu informasi yang berguna untuk mengetahui batas toleransi tanaman kedelai pada kondisi lahan marginal

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Tanaman Kedelai

Kedelai merupakan tanaman semusim, berupa semak rendah, tumbuh tegak, berdaun lebat, dengan beragam morfologi. Nama botani kedelai adalah *Glycine max.* L.Merrill. Tinggi tanaman berkisar 10–200 cm, dapat bercabang sedikit atau banyak tergantung kultivar dan lingkungan hidup. Tanaman kedelai mempunyai dua periode tumbuh yaitu periode vegetatif dan reproduktif. Periode vegetatif merupakan periode tumbuh dari munculnya tanaman dipermukaan tanah sampai padai terbentuknya bunga pertama dengan masa periode 4-8 minggu (Lamina, 1989).

Biji kedelai banyak mengandung protein dan lemak. Sebagai bahan makanan, kedelai lebih baik jika dibandingkan dengan kacang tanah, karena kandungan protein dan lemak pada kedelai lebih baik daripada kandungan protein dan lemak pada kacang tanah. Kandungan lemak kedelai tidak begitu tinggi (16-20%). Kedelai juga mengandung asam-asam tak jenuh yang dapat mencegah timbulnya *arterio sclerosis* (pengerasan pembuluh-pembuluh nadi). Maka, nilai kedelai bagi kesehatan sangat tinggi. Disamping itu, kandungan protein kedelai cukup tinggi dengan faktor cerna 75-80% dan asam-asam amino yang menyusun protein kedelai serupa dengan yang terdapat pada casein. Di negara-negara yang sumber konsumsi protein hewannya masih rendah, protein kedelai dapat menggantikan peranan protein hewani (AAK, 1989).

Fehr dan Caviness (1977) membagi pertumbuhan tanaman kedelai menjadi 2 fase pertumbuhan yaitu fase vegetatif (V1-V2) dan fase generatif (R1-R8). Fase vegetatif (V2) mempunyai deskripsi bahwa tanaman yang terbentuk hingga buku kedua dimana daun trifoliat yang sudah berkembang penuh terdapat pada buku diatas buku unifoliat.



2.2 Asimilasi Nitrogen dan Peranan Enzim *Nitrat reduktase* bagi Tanaman

Pertumbuhan tanaman ditentukan oleh kerjasama antara faktor genetik dan faktor lingkungan. Oleh sebab itu pengaruh gen tertentu berkaitan dengan pengaturannya pada proses metabolisme yang tidak dapat dipisahkan dari aktivitas enzim yang merupakan hasil pengaturan gen (Santosa, 1990).

Di dalam atmosfer, Nitrogen (N_2) terdapat dalam jumlah yang hampir tidak terbatas. N_2 sebelum dapat digunakan oleh tanaman, harus direduksi terlebih dahulu menjadi NH_3 dan difiksasi untuk menyusun asam amino. Fiksasi nitrogen di udara hanya dapat dilakukan oleh sejumlah kecil bakteri dan alga biru. Mikroorganisme tersebut hidup bebas didalam tanah atau bersimbiosis dengan tumbuh-tumbuhan, yang mempunyai arti penting secara ekonomis misalnya simbiosis antara bakteri dari *Rhizobium* dan tumbuh-tumbuhan legum. Dikarenakan tumbuhan ini memiliki kandungan protein yang tinggi (Koolman and Röhm, 1994).

Unsur nitrogen mempunyai peranan penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Di dalam jaringan tanaman nitrogen merupakan komponen penyusun dari banyak senyawa esensial bagi tumbuhan, misalnya asam-asam amino. Setiap molekul protein tersusun dari asam amino dan setiap enzim adalah protein, maka nitrogen juga merupakan unsur penyusun protein dan enzim (Lakitan, 1993).

Enzim merupakan suatu protein, termasuk nitrat reduktase yang sangat berperan dalam sintesis protein. Semua reaksi dalam tanaman memerlukan katalisator enzim, sehingga peran nitrat reduktase sangat penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Enzim Nitrat Reduktase adalah enzim pertama dalam jalur asimilasi nitrat dan mengkatalisis reduksi nitrat menjadi nitrit, sehingga dapat dikatakan bahwa nitrat reduktase menjadi faktor pembatas dalam jalur penggunaan nitrat oleh tanaman (Martino and Smarelli, 1989).

Umumnya tanaman menyerap unsur nitrogen dari tanah dalam bentuk nitrat, dan selanjutnya nitrat diubah menjadi asam amino oleh jalur asimilasi nitrat yang bertingkat. Laju pembatas dan tahap pengaturan asimilasinya terjadi

pada awal reaksi yang dikatalisis oleh nitrat reduktase (Beever and Hageman, 1969).

Nitrat Reduktase mempunyai aktivitas tertinggi pada daun tanaman yang masih muda dan sudah berkembang penuh. Penambahan umur daun akan memicu penurunan aktivitas NR (Srivastava dalam Huber *et al.*, 1992). Aktifitas NR juga kecil pada daun yang sangat muda dan belum berkembang penuh. Menurut Alnopri (1995) bahwa relatif kecilnya aktivitas enzim Nitrat Reduktase daun pada fase vegetatif karena daun belum berkembang secara penuh sehingga jumlah maupun aktivitas Nitrat Reduktasenya masih sangat rendah. Nitrat sebagai senyawa nitrogen yang diserap oleh tanaman mempunyai peranan penting terhadap aktivitas enzim ini.

Pengambilan dan asimilasi nitrogen terkait dengan ketersediaan karbon pada tanaman. Pada tingkat sel, pengambilan dan pengurangan nitrat serta perubahan amonium menjadi asam amino dan protein saling berhubungan pada metabolisme karbon dalam pembentukan energi, reduktan dan skeleton karbon. Rasio fotosintesis tanaman dipengaruhi oleh ketersediaan nitrogen, hasil dari fotosintesis pada tingkat sel telah diatur. Amonium mungkin menjadi faktor yang penting dalam pengaturan aliran karbon terhadap asam amino yang penting untuk sintesis protein dan atau sintesis sukrosa. Ketersediaan nitrogen sebagai alokasi karbon berhubungan dengan pertumbuhan tanaman dan produktivitas biji kedelai (Abrol, 1990).

Pemberian nitrat sebagai sumber nitrogen pada tanaman menyebabkan tanaman mengakumulasi sejumlah nitrat baik pada daun maupun akarnya dan aktivitas NR menjadi lebih besar (Sugiharto, 1996).

2.3 Pengaruh Salinitas terhadap Metabolisme dan Pertumbuhan Tanaman Kedelai

Kekurangan nutrisi dapat terjadi karena tidak terpenuhinya nutrisi dalam media tumbuh atau karena tidak dapat diabsorpsi dan di asimilasi oleh tanaman sebagai pengaruh dari kondisi lingkungan. Kekurangan nutrisi merupakan masalah yang umum yang terdapat hampir seluruh areal pertanaman di seluruh

dunia. Perbaikan areal tanam, merupakan hal yang penting dalam mengetahui kekurangan nutrisi penting atau nutrisi yang lain. Terdapat tiga metode penting untuk mengetahui kekurangan nutrisi pada tanaman: mengamati gejala yang nampak, tes tanah dan analisis tanaman (Fageria, 1992).

Pengembangan tanaman kedelai di Indonesia dapat dilakukan dengan memanfaatkan lahan-lahan marjin, misalnya di daerah pantai atau daerah pasang surut dengan kondisi garam tinggi (Pandiangan *et al.*, 1997). Adanya garam di daerah perakaran akan menurunkan potensial osmotik larutan tanah. Respon tanaman terhadap kondisi ini adalah hilangnya turgor, dan diikuti dengan menutupnya stomata. Penutupan stomata akan menghambat difusi CO_2 yang dibutuhkan untuk sintesis karbohidrat. Berkurangnya pertukaran gas (fotosintesis dan transpirasi) akhirnya akan menghambat pertumbuhan tanaman.

Pengaruh garam-garam bagi tanaman umumnya secara tidak langsung, yaitu melalui peningkatan tekanan osmotik pada air tanah sehingga menyulitkan tanaman menyerap air, terutama bagi kecambah dan perakaran tanaman. Jadi efeknya sama dengan tanah dalam keadaan kering. Pengaruh garam yang berlebihan dilingkungan perakaran terjadi karena pengaruh khusus ion-ion spesifik yang menghambat pertumbuhan tanaman melalui gangguan proses metabolisme dan pengaruh umum sebagai akibat penurunan potensial osmotik larutan media pertumbuhan dalam lingkungan perakaran. Hal tersebut dapat mengganggu sistem penyerapan air dan hara mineral (Haryadi dan Yahya, 1998).

Kersie dan Leshem (1994) menyatakan bahwa dampak cekaman garam terhadap pertumbuhan tanaman adalah menurunnya kemampuan tanaman untuk mengabsorpsi air, karena meningkatnya potensial osmotik sel akar yang melebihi potensial osmotik air tanah. Hal ini dapat menyebabkan terhambatnya perluasan dinding sel yang bersifat ireversible dan terjadi reduksi hasil fotosintesis.

Pengaruh negatif cekaman garam menyebabkan berkurangnya tingkat pembelahan sel, perluasan sel, penambahan luas daun, tanaman menjadi kerdil dan daun menjadi hijau pucat atau kuning. Garam memiliki pengaruh paling merusak terhadap tanaman muda pada waktu perkecambahan, konsentrasi garam

tinggi yang kemungkinan besar terkonsentrasi pada tempat sekitar bibit dapat memperlambat pertumbuhan.

Cekaman garam pada akar tanaman dapat meningkatkan laju respirasi, sehingga menghabiskan sukrosa yang lebih banyak. Berkurangnya suplai karbohidrat akibat stress garam atau kekurangan air akan mengurangi kemampuan *Rhizobium* dalam nodule akar. Hal ini akan menghambat pengiriman hasil fiksasi ke tanaman sehingga terjadi akumulasi senyawa N yang pada akhirnya akan menjadi penghambat balik (*feedback inhibition*) terhadap aktifitas nitrogenase atau asimilasi ammonia. Kondisi ini akan menyebabkan tanaman kekurangan N, sehingga mengganggu fotosintesis (Heckathorn *et al.*, 1997).

Cekaman garam (*Salt Stress*) merupakan salah satu faktor pembatas yang dapat menghambat pertumbuhan tanaman kedelai dan menurunkan produksi legum (kedelai), bila nutrisi N tergantung pada fiksasi N oleh nodul akar (Abd-Alla *et al.*, 1998). Tanaman dari spesies legum mempunyai kemampuan untuk merespon cekaman garam yang sangat bervariasi, mulai dari sangat sensitif sampai toleran. Hal ini karena kadar garam (NaCl) pada media tumbuh tinggi merupakan faktor pembatas yang ekstrim. Pada tanaman kedelai yang sensitif terhadap stres garam (NaCl) dengan konsentrasi 10 Mm telah menghambat pertumbuhannya (Lauchi dan Wieneke, 1979), sedangkan pada konsentrasi garam 60 mM atau lebih merupakan konsentrasi yang tinggi bagi tanaman kedelai.

Respon tanaman terhadap gangguan lingkungan seperti cekaman garam dan aplikasi nitrat secara nyata dapat menurunkan aktivitas enzim NI dan SS sehingga dapat menghambat proses hidrolisis sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa yang nantinya dijadikan sebagai sumber energi dan kerangka karbon dalam metabolisme nitrogen (Gordon *et al.*, 1997)

2.4 Hipotesis

Aktivitas Enzim Nitrat Reduktase pada daun tanaman kedelai selama fase vegetatif meningkat seiring dengan penambahan nitrat (KNO_3) saat mengalami cekaman garam.

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Bahan dan Alat

Bahan tanam : Bahan tanam yang digunakan adalah benih kedelai varietas Bromo, pasir steril, legin, larutan NaCl 60 mM, larutan hara makro yang berisi 2.96 mM KCl, 0.1 Mm K_2HPO_4 , 2.1 Mm $CaCl_2$, 1.8 Mm $MgCl_2$ dan unsur mikro 1.47 μ M $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.8 μ M $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.64 μ M $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 4.5 μ M H_3BO_3 , 0.7 μ M $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.17 μ M $CoSO_4 \cdot 2H_2O$, 0.01 μ M $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 55 μ M FeEDTA, aquadest, etanol panas 80%, buffer ekstraksi kedelai, *salicylic acid* dalam H_2SO_4 p.a, NaOH 2N, *sulfanil amide*, NED dan lain-lain.

Alat yang digunakan antara lain : mortar-stamper, *polybag*, gelas ukur, *beaker glass*, pipet, vortex, spektrofotometer, kuvet VIS, waterbath 30°C, *sentrifuse*, tabung reaksi, eppendorf, label dan alat-alat lain yang digunakan pada penelitian ini.

3.2 Pelaksanaan Penelitian

3.2.1 Perlakuan Penelitian

Kedelai yang ditumbuhkan pada media pasir dengan kondisi normal (0 mM NaCl) dan cekaman garam (60 mM NaCl) yang masing-masing diberi perlakuan nitrat (KNO_3) dengan konsentrasi 0; 2,5; 5 dan 7,5 mM.

Kombinasi perlakuan cekaman garam dan perlakuan nitrat, sebagai berikut:

0 mM NaCl (Kontrol)	0 mM KNO_3
	2,5 mM KNO_3
	5 mM KNO_3
	7,5 mM KNO_3
60 mM NaCl (Cekaman Garam)	0 mM KNO_3
	2,5 mM KNO_3
	5 mM KNO_3
	7,5 mM KNO_3

3.2.2 Penanaman

Benih kedelai varietas Bromo setelah diinokulasi dengan legin ditanam dalam *polybag* yang berisi pasir steril, setiap *polybag* diisi 5 benih. Benih yang telah tumbuh disiram dengan air biasa selama satu minggu setiap pagi dan sore sebanyak 200 ml.

3.2.3 Pemberian NaCl dan larutan hara

Memasuki awal minggu kedua (8-14 hst) dilakukan penyiraman dengan perlakuan NaCl dan nitrat (KNO_3) bersamaan dengan pemberian larutan nutrisi. Larutan nutrisi yang diberikan berdasarkan komposisi nutrisi dari Sexton *et al.* (1998) yang berisi larutan makro 2.96 mM KCl, 0.1 Mm K_2HPO_4 , 2.1 Mm CaCl_2 , 1.8 Mm MgCl_2 dan unsur mikro 1.47 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.8 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.64 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.5 μM H_3BO_3 , 0.7 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.17 μM $\text{CoSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 μM $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 55 μM FeEDTA yang diberikan setiap hari sebanyak 200 ml (pagi dan sore) sampai tanaman berumur 2 minggu.

3.2.4 Pemeliharaan

Pemeliharaan tanaman dengan penyiangan gulma dan pengendalian hama dan penyakit yang dilakukan sesuai kebutuhan. Disertai dengan pengamatan kelembaban udara, suhu dan intensitas cahaya.

3.2.5 Pemanenan

Panen dilakukan ketika tanaman telah berumur 2 minggu yang ditandai dengan munculnya daun trifoliat yang terbentuk dengan sempurna. Daun yang diambil adalah daun yang berada di pucuk dan sudah berkembang penuh atau daun trifoliatnya.

3.3 Analisis Laboratorium

Analisis laboratorium dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim NR, SS dan NI serta kandungan nitrat, nitrit, gula reduksi dan sukrosa yang tahapannya sebagai berikut:

3.3.1 Ekstraksi Enzim

Dauri digerus dengan N_2 cair dengan bantuan mortar stamper sampai halus kemudian ditambah dengan 3x volume buffer ekstraksi yang mengandung 50 mM Mops; $1\mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$, 5 mM NaF, 0.2% PVP, 2 mM β -ME, 5 mM EDTA, 0.2 PMSF dan digerus kembali. Hasil gerusan di sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 25 menit. Supernatan yang dihasilkan diambil dan digunakan sebagai sumber enzim untuk aktivitas Nitrat Reduktase, Sucrose Synthase dan Neutral Invertase.

3.3.2 Pengujian Aktivitas Nitrat Reduktase

Enzim hasil ekstraksi sebanyak 0.5 mL ditambahkan pada 1 mL larutan penguji yang mengandung 25 mM K-fosfat (pH 7.5), 10 mM kalium nitrat (KNO_3) dan 0.2 mM NADH serta ditambahkan H_2O sampai volume 2 mL. Setelah itu campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 0, 15, dan 30 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan 1 mL 1% sulfanilamida dalam 1.5.N HCl dan 0.02% N-Naptildiamin diklorida. Campuran dikocok dan diinkubasi selama 30 menit untuk melihat perubahan warnanya. Nitrit yang terbentuk ditentukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas NR dibandingkan dengan standar nitrit 0-20 nM NO_2 . Aktivitas NR didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat menghasilkan nitrit per satuan protein per satuan waktu.

3.3.3 Penentuan Kandungan Protein Terlarut

Kandungan protein diukur dengan menggunakan metode Bradford (Deutcher, 1990). Sampel ditambah dengan 1 mL larutan Bradford, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Hasil pembacaan dibandingkan dengan standart Bovine Serum Albumin (BSA) 1 mg/mL untuk mengetahui kandungan protein terlarut.

3.3.4 Ekstraksi Nitrat dari jaringan tanaman

Jaringan tanaman sebanyak 5 gram digerus dengan etanol panas 80%, homogenat disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm pada suhu 20°C selama 10 menit. Ambil supernatan (bagian bening). Pelet digerus kembali dengan etanol panas 80% dan disentrifugasi lagi. Ambil supernatan dan ulangi penggerusan hingga jaringan tampak berwarna keputihan. Supernatan dikumpulkan, lalu dikeringkan menggunakan rotary-evaporator. Sampel dilarutkan dengan sedikit air.

3.3.5 Penentuan Kandungan Nitrat jaringan

Kandungan nitrat ditentukan berdasarkan metode Cataldo *et al* (1975). Sampel sebanyak 50 μL dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan 200 μL 5% (V/W) salicylic acid dalam H_2SO_4 p.a., kemudian campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit, dan 5 mL 2 N NaOH ditambahkan secara perlahan-lahan. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Kandungan nitrat ditentukan dengan membandingkan standar nitrat.

3.3.6 Penentuan Kandungan Nitrit

Sampel sebanyak 400 μL ditambah 100 μL H_2O , ditambah dengan 500 μL 1% sulfanilamide dalam 1,5 N HCl dan 500 μL 0,02% N-naphthylethylenediamine di chloride. Setelah terjadi perubahan warna (ditunggu sampai 30 menit), selanjutnya OD diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi nitrit dihitung dengan membandingkan kurva standart nitrit.

3.3.7 Penentuan Aktivitas Enzim Sucrose Synthase

Aktivitas enzim Sucrose Synthase (SS) ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan dari sukrosa selama proses hidrolisis (Arai *et al.*, 1991), dimana konsentrasi gula reduksi ditentukan dengan metode Dinitrosalicylic acid (DNS). Larutan *reaction mixture for SS* sebanyak 500 μL yang mengandung

25 mM Mops-NaOH (pH 7,0), 100 mM sukrosa dan 2mM UDP ditambah dengan 400 μ L H₂O dan 100 μ L enzim. Campuran divorteks selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Tepat 30 menit, reaksi dihentikan dengan menambah reagen Dinitrosalicylic acid (DNS) sebanyak 500 μ L. Selanjutnya dididihkan pada *waterbath* selama 10 menit. Setelah 10 menit dipanaskan, campuran didiamkan pada air sampai dingin, kemudian dibaca OD-nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm. Fruktosa digunakan sebagai standar gula reduksi. Aktivitas SS didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi selama satu menit pada reaksi di atas.

3.3.8 Penentuan Aktivitas Enzim Invertase

Aktivitas enzim Neutral Invertase (NI) ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan dari sukrosa selama proses hidrolisis (Arai *et al.*, 1991), dimana konsentrasi gula reduksi ditentukan dengan metode Dinitrosalicylic acid (DNS). Larutan *reaction mixture for NI* sebanyak 500 μ L, mengandung 25 mM Mops-NaOH (pH 7,0), 100 mM sukrosa ditambah dengan 400 μ L dan 100 μ L enzim. Campuran divorteks selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Tepat 30 menit, reaksi dihentikan dengan menambah reagen Dinitrosalicylic acid (DNS) sebanyak 500 μ L. Selanjutnya dididihkan pada *waterbath* selama 10 menit. Setelah 10 menit dipanaskan, campuran didiamkan pada air sampai dingin, kemudian dibaca OD-nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm. Fruktosa digunakan sebagai standar gula reduksi. Aktivitas NI didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi selama satu menit pada reaksi di atas.

3.3.9. Pengukuran Gula Reduksi

Sampel sebanyak 100 μ L ditambah dengan 400 μ L H₂O dan 500 μ L reagent Dinitrosalicylic acid (DNS). Campuran di vortex, selanjutnya dipanaskan pada suhu 90°C selama 10 menit sampai warna merah coklat terbentuk. Setelah dingin absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 560

nm. Konsentrasi gula reduksi jaringan dihitung dengan membandingkan kurva standart fruktosa.

3.3.10 Penentuan Kandungan Sukrosa

Sampel sebanyak 50 μ l ditambah dengan 50 μ l H₂O dan 70 μ l 0,5 N NaOH dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian di panaskan pada air mendidih selama 10 menit untuk mengacurkan gula reduksi. Setelah dingin kemudian ditambahkan 250 μ l 0,1% Resorcinol dan 750 μ l 30% HCl secara perlahan yang kemudian dipanaskan kembali pada suhu 80°C selama 8 menit. Setelah dingin diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520.

3.4 Parameter Pengamatan

3.4.1 Parameter Utama

1. Aktivitas enzim Nitrat Reduktase

3.4.2 Parameter Pendukung

1. Kandungan Total Protein Terlarut (TPT)
2. Kandungan Nitrit dan Nitrat jaringan
3. Kandungan sukrosa
4. Aktivitas enzim Sucrose Synthase (SS) dan Neutral Invertase (NI)
5. Kandungan gula reduksi

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

1. Kondisi cekaman garam pada konsentrasi 60 mM dapat menurunkan aktivitas enzim Nitrat Reduktase pada fase vegetatif (V2) sebesar 83,26%.
2. Pemberian nitrat sebesar 7,5 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim Nitrat Reduktase saat tercekam garam pada fase vegetatif.
3. Kondisi cekaman garam konsentrasi 60 mM dapat menurunkan kandungan nitrat, nitrit dan sukrosa jaringan serta aktivitas enzim NI dan SS namun cekaman garam konsentrasi 60 mM dapat meningkatkan kandungan TPT serta gula reduksi.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan pemberian NaCl dan kadar N dalam jumlah yang bervariasi dan ragam varietas selama masa vegetatif, untuk lebih mengetahui batas toleransi kedelai terhadap cekaman garam dengan pemberian nitrat.



Unit OUP Perpustakaan
UNIVERSITAS JEMBER

DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1989. *Kedelai*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius. 10-15p.
- Abd.Alla, MH. 1992. Nodulation and nitrogen fixation in faba bean (*Vicia faba* L.) plants under salt stress. *Symbiosis* 12:311-319
- Abd-Alla, MH., TD Vuong and JE Harper, 1998. Genotypic Differences in Dinitrogen Fixation Response to NaCl Stress in Intact and Grafted Soybean. *Crop Sci*, 38:131-137.
- Abrol, YP. 1990. *Nitrogen in Higher Plants*. Research Studies Press Ltd. England. 298p.
- Adisarwanto, T dan R. Wudianto. 1999. *Meningkatkan Hasil Panen Kedelai di Lahan Sawah-Kering-Pasang Surut*. Penebar Swadaya. Jakarta. 37-39.
- Alnopri. 1995. Aktivitas Nitrat Reduktase sebagai Kriteria Seleksi Tanaman Kopi Berdaya Hasil Tinggi. *Journal Penelitian Universitas Bengkulu* 3:36-40.
- Arai M, H Mori and H Inaseki. 1991. Roles of Sucrose – Metabolizing Enzymes in Growth of Seedling, Purification of Acid Invertase from Growing Hypocotyls of Mung Bean Seedling. *Plant Cell Physiol*. 32: 1291-1298.
- Armstrong, FB. 1995. *Buku Ajar Biokimia*. Terjemahan R.T. Maulany. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC Jakarta. 335-367p
- Beever, L. and RH Hageman . 1969. Nitrat Reductase in Higher plant. *Ann. Rev. Plant Physiol* 20 : 495 – 522.
- Begum, FJ. L Karmoker. and QA Fattah. 1992. The Effect Of Salinity on Germination and Its Correlation With K^+ , Na^+ , Cl^- Accumulation in Germinating Seeds of *Triticum aestivum* L. cv. Akbar. *Plant Cell Physiol* 33:1009-1014.
- Caines, AM and C Shennan. 1999. Interactive Effects of Ca^{2+} and NaCl Salinity on the Growth of Two Tomato Genotypes Differing in Ca^{2+} Use Efficiency. *Plant Physiol* 37:569-576.
- Cataldo, DA. M Haroon, LE Scarader and UL Youngs. 1975. Rapid calorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of Salicylic acid. *Soil Science and Plant analysis*. Departement of Agronomy Univ. of Wisconsin Medions, 5(1) : 71-80

- Deutcher, MP. 1990. Method in enzymology: Guide to protein purification. *Academic Press California, USA*.
- Fagcria, NK. 1992. *Maximizing Crop Yields*. Marcel Dekker Inc:105-123
- Francois, LE, CM Grieve, EV Maas and SS Lesch. 1994. Time of Salt Stress Affect Growth and Yield Components of Irrigated Wheat. *Agron Journal* 86:100-107.
- Fehr, WR and CE Caviness. 1977. *Stages of Soybean Development*. Iowa State Univ. Spec. RPT.80. Coop. Ext. Service, Iowa State University, Ames, IA.
- Gordon, AJ, FR, Minchin, I, Skot and CL James. 1997. Stress Induced Declined in Soybean N₂ Ffixation are Related to Nodule Sucrose Synthase Activity. *Plant Physiol* 114 : 937 – 946.
- Harjadi, SS, dan S Yahya. 1988. *Fisiologi Stress Lingkungan*. PAU Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Heckathorn, SA, EH De Lucia and RE Zielinski. 1997. The Contribution of Drought, Related Decreases in Foliar Nitrogen Concentration to Decrease in Photosynthetic Capacity During and After Drought in Praire. *Plant Physiol*.
- Huber, SC, JJ, Huber, W, Campbell and MG Radinbaugh. 1992. Comparative studies of light nodulation of NR and sucrose phosphate syntase activities in spinach leaves. *Plant physiol* 33 : 639 – 646.
- Kersic, DB and Y Leshem. 1994. *Stress and Coping in Cultivated Plant*. Kluwoer Academic Publisher, London. 55-75p.
- Koolman, J, KII RÖhm. 1994. Color Atlas of Bio-Chemistry (Atlas Berwarna dan Teks Biokimia) :editor Sadikin M. *Hipokrates*. Jakarta.
- Lakitan, B. 1993. *Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan*. PT RajaGrafindo Persada, Jakarta.
- Lamina. 1989. *Kedelai dan Pengembangannya*. CV Simplex, Jakarta. 19-27p.
- Lauchli, A and J Wieneke. 1979. Studies on Growth and Distribution of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Soybean Varieties Differing in Salt Tolerance. *Pflanzenernahr Bodenked* 142 : 3 – 13.
- Martino, SJ and JR Smarelli. 1989. Nitrate Reductase Synthesis in Squash Cotyledones. *Plant Physiol* 106:817-821.

- Pandiangan, D. AH Siregar dan SNB Widiyanto. 1997. Profil Protein Lini Kalus Padi Kultivate Sei Lilin Hasil Uji Toleransi Terhadap Salinitas. *Eugenia*, 3: 209-221.
- Salisbury, FB and CW Ross. 1995. Fisiologi Tumbuhan Jilid 2. Bandung: Penerbit ITB. 67-85p.
- Santosa, 1990. *Fisiologi Tumbuhan*, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Setyobudi, B. 1993. Dasar-dasar Ilmu Tanah, Tanah Masam dan Tanah Garam. *Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jember*. 12-20p.
- Sexton, PJ, NC Paek and RM Schible. 1998. Effect of nitrogen source and timing of sulfure deficiency on seed yield and expression of 11S and 7S seed storage protein of soybean. *Field Crops Res* 59 : 1-8
- Soussi, M, A Ocana and C Liuch. 1988. Effect of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *J.Exp.Bot*.49:1329-1337.
- Srivashar, S, S Rothstein and A Oaks. 1997. Regulation nitrate by nitrogen and carbon metabolics in Maize seedling. *Plant Physiol* 114:583-584.
- Srivastava, HS. 1980. Regulation of Nitrate Reductase Activity on Higher Plants. *Phytochemistry*.19. 725-733
- Sugamama, N and TA LaRue. 1993. Comparison of Enzymes Involved in Carbon and Nitrogen Metabolism in Normal Nodules and Ineffective Nodules Induced by a Pea Mutant E135(*Sym 13*). *Plant Cell Physiol* 34:761-765.
- Sugiharto, B., 1996. Transformasi dan Asimilasi Unsur Nitrogen oleh Tanaman. Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Talbott, LD and E Zeiger. 1998. The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *J. Exp.Bot* : 329-337
- Vessey, JK, KB Walsh and DB Layzell. 1988. Oxygen Limitation Of N₂ Fixation in Stem-Girdled and Nitrate-treated Soybean. *Physiol Plant* 73:113-121.

