



**AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE DAUN KEDELAI
FASE R1 (Awal Berbunga) PADA PEMBERIAN NITRAT
DALAM KONDISI CEKAMAN GARAM (*Salt Stress*)**

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

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

Oleh :

Khristiningrum Utami

NIM. 991510101026



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS PERTANIAN
Juni, 2003**

KARYA ILMIAH TERTULIS BERJUDUL

**AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE DAUN KEDELAI
FASE R1 (Awal Berbunga) PADA PEMBERIAN NITRAT
DALAM KONDISI CEKAMAN GARAM (*Salt Stress*)**

Dipersiapkan dan disusun oleh


Khristingrum Utami
NIM. 991510101026

Telah diuji pada tanggal
27 Juni 2003

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

TIM PENGUJI

Ketua,


Ir. Miswar, MSi.
NIP. 131 880 473

Anggota I



Tri Agus Siswyo, SP., M.Agr., Ph.D
NIP. 132 207 406

Anggota II



Ir. Usmadi, MP
NIP. 131 759 530

MENGESAIKAN

Dekan,



Ir. Arie Mudjiharjati, MS
NIP. 130 609 808

DOSEN PEMBIMBING :

Ir. Miswar, MSi (DPU)

Tri Agus Siewoyo, SP.,M.Agr.,Ph.D (DPA)

Karya Ilmiah Tertulis ini kupersembahkan untuk :

- ❖ **Ibundaku tercinta “Lucilla Suparmi”, atas doa, kasih sayang serta perhatiannya yang tulus hingga terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis ini.**
- ❖ **Adik-adikku terkasih, “Candra Dewi” dan “Satria” yang selalu memberiku semangat untuk terus berkarya**
- ❖ **Engkau yang selalu setia mengasihiku**
- ❖ **Almamaterku yang kubanggakan, Universitas Jember**

KATA PENGANTAR

Penelitian yang berjudul “**Aktivitas Nitrat reduktase Daun Kedelai Fase RI (Awal Berbunga) pada Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam (Salt Stress)**” disusun karena melihat kemungkinan yang dapat dilakukan dalam memanfaatkan lahan-lahan marginal dengan kondisi salin (tercekam garam) untuk dapat digunakan sebagai areal penanaman kedelai, utamanya dalam hal penggunaan unsur nitrogen.

Penulis mengucapkan syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah melimpahkan kasih dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Ilmiah Tertulis ini dengan baik dan lancar.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Ir. Arie Mudjiharjati, MS dan Dr. Ir. Sri Hartatik, MS selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember dan Ketua Jurusan Budidaya Pertanian yang telah memberikan bantuan perijinan dalam menyelesaikan Karya Ilmiah Tertulis ini. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ir. Miswar, MSi dan Tri Agus Siswoyo, SP.,M. Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Anggota I yang telah membimbing, memberikan saran dan motivasi kepada penulis selama penelitian sampai penulisan Karya Ilmiah Tertulis ini, serta pinjaman pustakanya yang mendukung kelancaran penulisan Karya Ilmiah Tertulis ini. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Ir. Usmadi, MP selaku Dosen Pembimbing Anggota II yang telah bersedia membimbing dan meluangkan waktu untuk mengoreksi penulisan Karya Ilmiah Tertulis ini.

Penelitian ini juga terselenggara dengan baik berkat bantuan Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.sc beserta staf Pusat Penelitian Biologi Molekuler UNEJ yang telah memberikan sarana dan prasarana selama penelitian berlangsung. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada teman-teman seperjuangan penulis di Lab. Biomol, Fafan dan Mbak Niken, Norma, Suwadi serta yang lainnya yang dengan setia menolong dan memberikan masukan. Tanpa kalian penulis tidak akan bisa menyelesaikan Karya Ilmiah Tertulis ini. Juga saudara-saudaraku terkasih, Hansel, Heny, Eben, Estrin, Ata', Yustin, Diah, Ivo,

Ita' dan teman-teman UKKMK yang lain yang telah memberikan perhatian dan dukungan doa selama penulisan Karya Ilmiah Tertulis ini. Serta yang tak terlupakan teman-teman asisten Statistik dan Rancob yang selalu memberikan semangat dan juga sahabat-sahabat setiaku arek-arek Agro'99, Herta, Vivi, Tauhid, Ana, Indro, Sarip, Nopiah, Dani dan yang lainnya, serta seluruh warga HIMAGRO. Terima kasih atas kebersamaanya. Bersama kalian adalah saat terindah yang tidak bisa penulis lupakan.

Penulis menyadari bahwa kesempurnaan adalah bukan milik manusia, sehingga saran dan kritik dari pembaca akan diterima dengan senang hati oleh penulis. Semoga apa yang tertuang dalam karya ini dapat bermanfaat bagi para pembaca sekalian.

Jember, 27 Juni 2003

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN DOSEN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
RINGKASAN	xi
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Asimilasi Nitrogen dan Peranan <i>Nitrat reduktase</i> pada Tanaman	5
2.2 Pengaruh Salinitas terhadap Metabolisme dan Pertumbuhan Tanaman Kedelai.....	6
2.3 Hipotesis	8
III. BAHAN DAN METODE	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	9
3.2 Bahan dan Alat	9
3.3 Metode Penelitian	
3.3.1 Perlakuan Penelitian	9
3.3.2 Penanaman	10
3.3.3 Ekstraksi Enzim	10
3.3.4 Pengujian Aktivitas <i>Nitrat reduktase</i>	11
3.3.5 Penentuan Kandungan Protein Terlarut	11

3.3.6	Ekstraksi Nitrit dan Nitrat dari Jaringan Tanaman	11
3.3.7	Penentuan Kandungan Nitrit Jaringan	12
3.3.8	Penentuan Kandungan Nitrat Jaringan	12
3.3.9	Pengukuran Aktivitas <i>Sucrose synthase</i>	12
3.3.10	Pengukuran Aktivitas <i>Invertase</i>	13
3.3.11	Pengukuran Gula Reduksi	13
3.3.12	Pengukuran Kandungan Sukrosa	13
3.4	Parameter Penelitian	14
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Hasil	
4.1.1	Aktivitas <i>Nitrat reduktase</i>	15
4.1.2	Kandungan Total Protein Terlarut	16
4.1.3	Kandungan Nitrit Jaringan	17
4.1.4	Kandungan Nitrat Jaringan	18
4.1.5	Aktivitas <i>Sucrose synthase</i> dan <i>Neutral invertase</i>	19
4.1.6	Kandungan Gula Reduksi Jaringan	20
4.1.7	Kandungan Sukrosa Jaringan	21
4.2	Pembahasan	21
V. KESIMPULAN		
5.1	Kesimpulan	27
5.2	Saran	27

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR GAMBAR

No	Judul Gambar	Halaman
1	Aktivitas spesifik NR daun kedelai fase R1 pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.....	16
2	Regresi linier penambahan nitrat dengan aktivitas spesifik NR pada tanaman kontrol dan cekaman garam.....	16
3	Kandungan Total Protein Terlarut (TPT) daun kedelai fase R1 pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.....	17
4	Kandungan nitrit jaringan daun kedelai fase R1 pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.....	18
5	Kandungan nitrat jaringan daun kedelai fase R1 pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.....	18
6	Aktivitas spesifik SS daun kedelai fase R1 pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.....	19
7	Aktivitas spesifik NI daun kedelai fase R1 pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.....	20
8	Kandungan gula reduksi jaringan daun kedelai fase R1 pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.....	20
9	Kandungan sukrosa jaringan daun kedelai fase R1 pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.....	21
10	Reaksi reduksi nitrat dan asimilasinya dalam hubungannya dengan metabolisme karbohidrat.....	24

DAFTAR SINGKATAN

NR	:	<i>Nitrat reduktase</i>
SS	:	<i>Sucrose synthase</i>
NI	:	<i>Neutral invertase</i>
EDTA	:	Ethylenediamine Tetra acetic acid
MOPs	:	3-(N-Morpholino) Propane Sulfonic Acid
PVP	:	Polyvinil Pyrrolidone
β -ME	:	β -mercaptoethanol
PMSF	:	Phenylmethylsulfonyl fluoride
UDP	:	Uridin Diphosphic Glukosa
NADH	:	Nicotinamide Adenin Dinucleotida
NED	:	N-naphthylethylenediamine dichloride
DNS	:	Dinitrosalicelyic acid
BSA	:	Bovine Serum Albumin
g BS	:	gram berat segar

RINGKASAN

AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE DAUN KEDELAI FASE R1 (Awal Berbunga) PADA PEMBERIAN NITRAT DALAM KONDISI CEKAMAN GARAM (*Salt Stress*)

KHRISTININGRUM UTAMI

Fakultas Pertanian, Universitas Jember

Unsur nitrogen mempunyai peranan yang penting dalam pembentukan asam amino dalam tanaman. Nitrogen yang diserap dalam bentuk nitrat akan direduksi menjadi ammonia melalui 2 langkah proses yang dikatalisis oleh *Nitrat reduktase* (NR) dan *Nitrit reduktase* (NiR). Suplai nitrogen melalui fiksasi N_2 oleh simbiosis terhambat selama kondisi cekaman garam sehingga perlu dilakukan penambahan nitrat untuk mencukupi kebutuhan nitrogen tanaman. Ketersediaan nitrat dalam jaringan akan meningkatkan aktivitas NR karena nitrat merupakan substrat yang menginduksi aktivitas NR di sitosol sehingga sintesis enzim menjadi lebih cepat. Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui aktivitas NR daun kedelai fase R1 (awal berbunga) pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.

Bahan utama yang dipergunakan dalam penelitian adalah kedelai varietas Bromo yang diinokulasi dengan *Rhizobium* sp. Kedelai ditumbuhkan pada media pasir bersih dalam kondisi lingkungan normal (0 mM NaCl) dan cekaman garam (60 mM NaCl) yang masing-masing diberi perlakuan nitrat dengan konsentrasi 0; 2,5; 5 dan 7,5 mM KNO_3 . Setelah tanaman berumur 35 hari (fase R1), daun dianalisis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian nitrat pada kondisi cekaman garam dapat menginduksi aktivitas NR daun kedelai di sitosol. Aktivitas NR tanaman yang mengalami cekaman garam terus meningkat dengan adanya penambahan konsentrasi nitrat meskipun aktivitasnya lebih rendah dibanding tanaman kontrol. Aktivitas NR tanaman tercekam garam dengan pemberian nitrat pada konsentrasi 0; 2,5; 5; 7,5 mM masing-masing turun menjadi 33, 34, 26, dan 41 % dari aktivitas tanaman kontrol. Penambahan konsentrasi nitrat tiap 2,5 mM meningkatkan aktivitas NR tanaman tercekam garam sebesar 1,7; 1,77 dan 2,7 kali dari tanaman yang tidak diberi perlakuan nitrat. Akumulasi dari nitrat, nitrit, gula reduksi dan sukrosa di daun dipengaruhi oleh kondisi cekaman garam, demikian juga dengan aktivitas *Sucrose synthase* (SS) maupun *Neutral invertase* (NI).

Kata kunci : kedelai, nitrat, cekaman garam, NR, SS, NI



I. PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Permasalahan

Kedelai (*Glycine max* L. Merr) merupakan salah satu komoditas pertanian penting karena bermanfaat untuk mencukupi gizi tubuh yaitu sebagai pendukung utama dalam pemenuhan protein nabati, bermanfaat untuk diolah sebagai bahan makan ternak, bahan baku berbagai industri serta sebagai komoditi ekspor non migas. Kebutuhan kedelai di dalam negeri tiap tahun cenderung terus meningkat, sedangkan persediaan produksi belum mampu mengimbangi permintaan. Berdasarkan perkiraan Departemen Pertanian tentang proyeksi produksi dan penyediaan bahan pangan tahun 1980 – 2000, produksi kedelai Indonesia pada tahun 2000 diproyeksikan sekitar 1.887.000 ton, sedangkan permintaan mencapai 2.108.000 ton (Rukmana dan Yuniarsih, 2001). Permintaan kedelai akan terus meningkat sejalan dengan pertumbuhan jumlah penduduk, membaiknya pendapatan per kapita, meningkatnya kesadaran masyarakat akan kecukupan gizi, dan berkembangnya berbagai industri pakan ternak. Untuk memenuhi permintaan kedelai dalam negeri, Indonesia masih melakukan impor. Salah satu faktor penyebab Indonesia sebagai negara agraris tidak mampu memenuhi permintaan kedelainya sendiri yaitu karena luas areal pertanian yang cenderung menurun karena berubahnya fungsi lahan pertanian ke non pertanian, seperti untuk industri dan perumahan. Hal ini yang menyebabkan luas areal panen kedelai di dalam negeri relatif tetap, bahkan sebenarnya kurang dari data yang telah dicatat (Adisarwanto dan Wudianto, 1999).

Pengembangan tanaman kedelai di Indonesia dapat dilakukan dengan memanfaatkan lahan-lahan marginal, misalnya di daerah pantai atau daerah pasang surut dengan kondisi tanah dengan kadar garam tinggi (Pandiangan dkk., 1997). Jenis tanah yang terdapat di daerah pasang surut yaitu tanah glei humus, glei humus rendah, aluvial hidromorf, podsol, podsol air tanah, dan argonosol. Jenis tanah tersebut tersebar di pantai Kalimantan timur, barat dan selatan, di pantai Jawa Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, pantai timur dan barat Sumatera, pantai-pantai selatan, barat dan utara Irian Jaya (Sarief, 1986). Namun kondisi

tanah yang salin ini mempunyai permasalahan yang cukup kompleks, salah satu diantaranya adalah dalam penyerapan unsur nitrogen yang penting bagi pertumbuhan tanaman.

Unsur di alam terdiri dari sejumlah besar nitrogen yang terdapat dalam bentuk protein, asam nukleat dan bentuk biomolekul yang lain. Nitrogen pada tanaman kedelai seperti juga pada tanaman legum yang lain, dapat dipenuhi melalui fiksasi N_2 dan asimilasi nitrogen mineral. Dua sumber nitrogen ini dapat bersifat saling melengkapi (sinergistik) atau berlawanan (antagonistik) dalam hubungannya dengan faktor lingkungan ataupun masa pertumbuhan tanaman (Wery *et al.*, 1986). Pada sebagian besar tanah dimana kandungan nitrat cukup, proporsi nitrogen yang berasal dari fiksasi simbiotik sekitar 50%, tetapi dapat mencapai 75% pada tanah lempung berpasir (Hardarson *et al.*, 1984; Bergersen *et al.*, 1985; Zapata *et al.*, 1987).

Fiksasi N_2 oleh nodul akar legum dapat dihambat oleh adanya gangguan lingkungan seperti *defoliasi*, kekeringan, salinitas, dan aplikasi nitrat (Gordon *et al.*, 1997; Soussi *et al.*, 1998). 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 (Alla, 1992). Pada kondisi tercekam, simbiosis antara tanaman legum dengan bakteri *Rhizobium* akan terganggu, pembentukan nodul menjadi terhambat sehingga akan mengganggu proses fiksasi N_2 dan menyebabkan berkurangnya suplai nitrogen melalui fiksasi N_2 .

Pada umumnya nitrogen diserap tanaman dalam bentuk ammonium (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 (Armstrong, 1995). Guerrero *et al.* (1981) menyatakan bahwa nitrat diserap dari dalam tanah melalui akar kemudian direduksi menjadi ammonia. Ammonia selanjutnya oleh tanaman diubah menjadi asam nukleat, asam amino, protein, dan senyawa esensial lainnya.

Nitrat direduksi menjadi ammonia melalui 2 langkah proses yang dikatalisis oleh *Nitrat reduktase* (NR) dan *Nitrit reduktase* (NiR). Aktivitas NR berhubungan dengan nilai fotosintesis dan ketersediaan rangka karbon dikontrol pada tingkat transkripsi dan post translasi (Kaiser *et al.*, 1993). Transkripsi gen NR diinduksi oleh NO_3^- (Cheng *et al.*, 1986), selain itu gula hasil fotosintesis juga berperan untuk menginduksi aktivitas NR (Cheng *et al.*, 1992).

Reduksi nitrat dapat terjadi di akar maupun di daun, tergantung dari spesies tanamannya, masa pertumbuhan tanaman serta penambahan nitrat. Pada kebanyakan tanaman *herbaceous*, asimilasi nitrat terutama terjadi di daun, meskipun asimilasi nitrat di akar kadang berlangsung pada masa pertumbuhan awal tumbuhan ini (Heldt, 1999). Secara umum apabila konsentrasi nitrat eksternal meningkat, proporsi yang ditransportasikan ke pucuk untuk reduksi juga meningkat (Lea dan Leegood, 1993).

Fchr dan Caviness (1977) membagi pertumbuhan tanaman kedelai menjadi 2 fase pertumbuhan yaitu fase vegetatif (V1-V3) dan fase generatif (R1-R8). Fabre dan Planchon (2000) dalam penelitiannya menyatakan bahwa aktivitas NR mencapai maksimum mendekati masa berbunga penuh (R2) dan kemudian menurun sesudahnya. Fase sebelum berbunga penuh disebut fase R1, yaitu fase dimana tanaman kedelai sudah mempunyai bunga terbuka pertama pada buku manapun pada batang utama.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas NR yang terjadi di daun kedelai pada fase R1 (awal berbunga), dalam kondisi tercekam garam dan adanya aplikasi nitrat.

1.2 Perumusan Masalah

Kedelai mampu bersimbiosis dengan bakteri pemfiksasi N_2 seperti *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* dan *Azorhizobium* yang dapat memfiksasi N_2 dari udara sebagai suplai nitrogen bagi tanaman. Cekaman garam (*salt stress*) 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.

Cekaman garam pada media tumbuh dapat menyebabkan menurunnya potensial osmotik larutan tanah, dapat 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 bagi tanaman, sehingga mempengaruhi metabolisme nitrogen termasuk enzim-enzim yang terlibat di dalamnya. Salah satunya adalah NR yang mengkatalisis reduksi nitrat menjadi nitrit.

Tanaman kedelai yang mencapai fase R1 sangat membutuhkan suplai nitrogen untuk proses pembentukan bunga, sehingga harus tersedia dalam jumlah yang cukup di dalam tanaman. Berkurangnya suplai nitrogen karena terhambatnya fiksasi N_2 dapat dipenuhi dengan melakukan penambahan nitrat dari luar. Nitrat merupakan salah satu bentuk nitrogen yang dapat diserap oleh tanaman dan merupakan substrat yang menginduksi aktivitas NR di sitosol untuk mereduksi nitrat menjadi nitrit. Apabila konsentrasi nitrat eksternal meningkat, proporsi yang ditransportasikan ke pucuk untuk reduksi juga meningkat.

Dari uraian di atas kemudian timbul suatu permasalahan yaitu apakah penambahan nitrat (KNO_3) dapat meningkatkan aktivitas NR daun kedelai fase R1 (awal berbunga) yang mengalami cekaman garam.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas NR daun kedelai fase R1 (awal berbunga) pada pemberian nitrat dalam kondisi cekaman garam.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai hubungan aktivitas NR dengan pemberian nitrat terhadap pertumbuhan tanaman dalam kondisi cekaman garam, yang dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut dalam usaha untuk meningkatkan hasil produksi tanaman kedelai pada media yang mengalami cekaman garam.

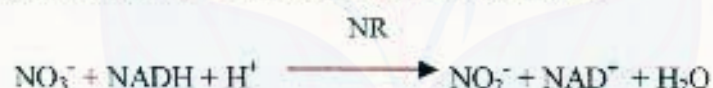


II. TINJAUAN PUSTAKA

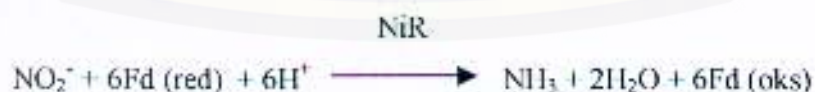
2.1 Asimilasi Nitrogen dan Peranan Nitrat reduktase pada Tanaman

Nitrogen diserap oleh tanaman dalam bentuk ion nitrat (NO_3^-) atau ammonium (NH_4^+). Asimilasi nitrogen pada tanaman melibatkan beberapa enzim diantaranya adalah *Nitrate reduktase* (NR), *Nitrite reduktase* (NiR), *Glutamine synthetase* (GS) dan *Glutamate synthase* (GOGAT) (Anderson dan Beardall, 1992). Baik nitrat maupun ammonium dalam tanaman disintesa menjadi asam amino dan lebih lanjut disintesa menjadi protein yang bertindak sebagai enzim pada metabolisme tanaman. Semakin besar unsur nitrogen yang diserap oleh tanaman, semakin tinggi pula unsur karbon yang diperlukan untuk sintesis asam amino, lebih lanjut bisa diduga semakin besar pula fotosintesanya (Sugiharto *et al.*, 1990).

Menurut Salisbury dan Ross (1995), reduksi nitrat menjadi ammonium terjadi dalam dua reaksi yang berbeda yang dikatalisis oleh enzim yang berlainan. Reaksi pertama, nitrat direduksi menjadi nitrit dikatalisis oleh NR, enzim yang mengangkut dua elektron dari NADH atau NADPH pada beberapa spesies. Hasilnya berupa nitrit (NO_2^-), $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ dan H_2O .



Reaksi kedua dari keseluruhan proses reduksi nitrat adalah perubahan nitrit menjadi NH_4^+ . Nitrit yang ada di sitosol akibat kerja NR diangkut ke dalam kloroplast daun atau ke dalam proplastid di akar tempat terjadi reaksi reduksi nitrit menjadi NH_4^+ yang dikatalisis oleh NiR. Di daun, reduksi NO_2^- menjadi NH_4^+ memerlukan 6 elektron yang diambil dari H_2O pada sistem pengangkutan elektron non siklik kloroplast. Reaksinya adalah sebagai berikut :



Beveer dan Hageman (1969) menyatakan bahwa NR merupakan enzim yang berperan dalam proses asimilasi NO_3^- karena enzim ini merupakan enzim pembatas terhadap laju pengaturan asimilasi NO_3^- pada awal reaksinya.

Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa NR merupakan faktor pembatas dalam jalur penggunaan nitrat oleh tanaman (Martino and Smarrelli, 1989).

Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa 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). Ketersediaan nitrat dalam jaringan tanaman mempengaruhi aktivitas NR, karena aktivitasnya diinduksi oleh adanya substrat nitrat. Campbell (1988) menyatakan bahwa nitrat yang tinggi di sitosol dapat meningkatkan aktivitas NR karena sintesis enzim menjadi lebih cepat.

Harper (1972) dalam penelitiannya menyatakan bahwa aktivitas NR pada daun kedelai tidak terdeteksi bila tanaman ditumbuhkan pada media yang tidak mengandung nitrat. Sebaliknya bila nitrat diberikan pada media tanam, aktivitas NR dapat terdeteksi pada seluruh fase tumbuh. Nitrat Reduktase mempunyai aktivitas tertinggi pada daun tanaman yang masih muda dan sudah berkembang penuh. Penambahan usia daun akan memicu penurunan aktivitas NR seperti pernyataan Srivastava (1980). Aktifitas NR juga kecil pada daun yang sangat muda dan belum berkembang penuh. Menurut Alnopri (1995) bahwa relatif kecilnya nilai aktivitas NR daun pada fase vegetatif karena daun belum berkembang secara penuh sehingga jumlah maupun aktivitas NR masih sangat rendah.

2.2 Pengaruh Salinitas terhadap Metabolisme dan Pertumbuhan Tanaman Kedelai

Cekaman garam merupakan salah satu faktor pembatas utama bagi pertumbuhan dan produksi pada sebagian besar tanaman, terlebih apabila kebutuhan nitrogen bergantung pada fiksasi N_2 melalui simbiosis (Lauter *et al.*, 1981; Alla, 1992). Cekaman garam dapat mempengaruhi simbiosis antara legum dengan bakteri *Rhizobium*. Menurut Zahran dan Sprent (1986), cekaman garam dan kekeringan keduanya menghambat penyebaran rambut-rambut akar dan menurunkan jumlah nodul akar. Pengaruh cekaman garam pada nodul akar adalah menurunkan jumlah koloni *Rhizobium* dan mempengaruhi perkembangan

rambut-rambut akar. Fungsi nodul akar sebagai penambat nitrogen udara diturunkan oleh karena pengaruh cekaman garam (Alla, 1992). Fiksasi N_2 oleh nodul akar dihambat selama kondisi cekaman garam sehingga suplai nitrogen ke daun menjadi berkurang. Efeknya semakin nyata dengan semakin lamanya periode cekaman garam (Rabie dan Kumazawa, 1988).

Spesies legum mempunyai tanggapan yang berbeda terhadap cekaman garam, dapat dikategorikan dari sangat sensitif (*extremely sensitiv*) sampai dengan toleran (Lauchli, 1984; Cordovilla *et al.*, 1995). Konsentrasi NaCl yang rendah (10 mM) dapat menghambat pertumbuhan kedelai yang sensitif terhadap cekaman garam (Lauchli and Wieneke, 1979). Grattan and Mass (1988) melaporkan bahwa konsentrasi garam yang tinggi (60, 80, dan 120 mM NaCl) dapat menurunkan pertumbuhan kedelai. Pada konsentrasi NaCl 60 mM, tanaman kedelai masih toleran terhadap cekaman garam dan masih dapat membentuk nodul meskipun berat kering nodul sangat rendah dibanding tanaman yang tidak mengalami cekaman garam (Alla, 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 larutan tanah. Respon tanaman terhadap kondisi ini adalah hilangnya turgor dan diikuti oleh menutupnya stomata. Penutupan stomata akan menghambat pertukaran gas dalam proses fotosintesis. Pada kondisi yang tidak menguntungkan seperti cekaman kekeringan dan kegaraman tinggi (tanah salin), tanaman akan menurunkan proses fotosintesis (Flower dan Yeo, 1982) dan respirasi (Criddle *et al.*, 1989). Pada kedua kondisi tersebut tanaman akan mengalami stress osmotik yang merupakan salah satu faktor pembatas pertumbuhan dan produktifitas tanaman.

Efek negatif cekaman garam pada fiksasi N_2 pada tanaman legum adalah mengurangi suplai fotosintat pada nodul (Bekki *et al.*, 1982; Georgiev and Atkins, 1993), mengurangi suplai substrat respirasi kepada *bakteroid* (Delgado *et al.*, 1994), dan perubahan dalam *oxygen diffusion barrier* (Serraj *et al.*, 1994). Berkurangnya suplai karbohidrat akibat cekaman garam atau kekurangan air akan

mengurangi kemampuan *Rhizobium* dalam nodul akar sehingga dapat menurunkan suplai nitrogen melalui fiksasi N_2 .

Cekaman garam memacu akumulasi dari ammonium, nitrat dan asam amino bebas di tanaman dan cenderung untuk menekan dari aktivitas enzim yang terlibat di dalam asimilasi ammonium (Soussi *et al.*, 1998). Penurunan aktivitas NR karena cekaman garam juga sangat dipengaruhi oleh fotosintesis. Hal ini disebabkan karena sukrosa, sebagai hasil fotosintesis, menginduksi aktivitas NR pada daerah akar (Srivashar *et al.*, 1997).

Karbohidrat (sukrosa) hasil fotosintesis tanaman inangnya (kedelai) yang ditransportasikan ke akar melalui phloem tidak dapat digunakan secara langsung sebagai sumber karbon dan energi untuk proses metabolisme nitrogen, tetapi harus dipecah terlebih dahulu. Terdapat dua jenis 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).

2.3 Hipotesis

Penambahan nitrat (NO_3^-) dapat meningkatkan aktivitas NR daun kedelai fase R1 (awal berbunga) yang mengalami cekaman garam.

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di rumah kaca Fakultas Pertanian Universitas Jember dan Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Desember 2002 sampai dengan April 2003.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan tanam yang digunakan dalam penelitian ini adalah kedelai varietas Bromo. Bahan kimia yang digunakan diantaranya NADH, *Sulfanilamide*, NED, *Salicylic acid*, DNS dan bahan kimia lainnya dengan kualifikasi cocok untuk penelitian yang diproduksi oleh perusahaan bahan kimia Sigma dan E-merk (Jerman).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *mortar stumpler*, *spektrofotometer*, *refregerated centifuge*, *mikro pipet*, *rotary evaporator*, neraca digital, *waterbath* dan alat-alat lain yang digunakan pada laboratorium kimia.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Perlakuan Penelitian

Kedelai ditumbuhkan pada media pasir bersih dalam kondisi lingkungan 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, yaitu 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

3.3.2 Penanaman

Benih kedelai varietas Bromo ditanam dalam polybag yang berisi media pasir bersih, satu polybag berisi 3 benih. Sebelum ditanam, benih diinokulasi dengan *Rhizobium Sp.* Benih yang ditanam tersebut disiram menggunakan air biasa/aquadesh selama 7 hari. Setelah tanaman berumur 7 hari atau kotiledonnya telah lepas, tanaman mulai diberi perlakuan NaCl dan nitrat (KNO_3) bersamaan dengan penyiraman larutan nutrisi.

Larutan nutrisi yang diberikan berdasarkan komposisi nutrisi dari Sexton *et al.* (1998) yang berisi unsur 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.

Penyiraman larutan nutrisi dan perlakuan dilakukan setiap hari (pagi dan sore) sebanyak 200 ml/polybag untuk minggu ke II, 250 ml/polybag untuk minggu ke III, 300 ml/polybag untuk minggu ke IV dan V. Setelah diperlakukan selama 35 hari (saat tanaman berbunga 30-50% atau mencapai fase R1) kemudian dilakukan pemanenan daun. Contoh daun yang digunakan dalam analisa enzim adalah daun yang sudah berkembang penuh (diambil dari buku kedua dan ketiga). Daun ditimbang kemudian disimpan dalam nitrogen cair atau dalam freezer -80°C sampai dianalisis.

3.3.3 Ekstraksi Enzim

Ekstraksi enzim dilakukan dengan cara menggerus jaringan tanaman dengan bantuan N_2 cair dalam *mortar stumpler* dingin. Setelah halus kemudian ditambahkan larutan buffer ekstraksi yang mengandung 50 mM Mops; 5 mM NaF ; 1 μM Na_2MoO_4 ; 0,2 % PVP; 2 mM β -ME; 5 mM EDTA dan 0,2 PMSF dengan volume 3 kali berat sampel selanjutnya digerus kembali. Homogenat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm, 4°C selama 15 menit. Setelah disentrifugasi supernatan diambil dan digunakan sebagai sumber enzim.

3.3.4 Pengujian Aktivitas Nitrat reduktase

Aktivitas NR diuji menggunakan larutan penguji dengan komposisi sebagai berikut : 500 μL 0,1 M Buffer Kpi (pH 7,5), 200 μL 0,1 M KNO_3 , 100 μL 5 mM NADH, 100 μL sampel dan kemudian ditambahkan H_2O sampai volumenya 1 mL. Campuran dikocok (*dimixture*) dengan menggunakan vortex selanjutnya diinkubasi pada suhu 30° C selama 0, 20, dan 30 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan 1 mL 1% sulfanilamida dalam 1,5 N HCl dan 1 mL 0,02% N-naphthylethylenediamine dichloride. Intensitas warna yang terbentuk diukur menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi nitrit dihitung dengan membandingkan kurva standar nitrit (0-45 μL 0,2 mM NaNO_2). Satu unit aktivitas spesifik NR sama dengan ng $\text{NO}_2/\mu\text{g}$ protein/jam.

3.3.5 Penentuan Kandungan Protein Terlarut

Kandungan protein diukur dengan menggunakan metode Bradford (Deutscher, 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.

3.3.6 Ekstraksi Nitrat dan Nitrit dari Jaringan Tanaman

Jaringan tanaman sebanyak 1 g digerus dan dilarutkan dengan 5 mL etanol panas 80%. Homogenat kemudian diinkubasi pada suhu 60° C selama 10 menit, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm, 20° C selama 10 menit. Supernatan kemudian diambil dan pelet digerus kembali dengan etanol panas 80% dan disentrifugasi lagi. Penggerusan diulangi lagi sampai pelet berwarna keputihan. Supernatan dikumpulkan jadi satu kemudian dikonsentrasikan menggunakan *rotary-evaporator*. Hasil evaporasi (konsentrat) merupakan sampel untuk analisa kandungan nitrat dan nitrit.

3.3.7 Penentuan Kandungan Nitrit Jaringan

Sampel sebanyak 400 μL ditambah 100 μL H_2O , ditambah dengan 500 μL 1% sulfamilamide dalam 1,5N HCl dan 500 μL 0,02% N-naphthylethylenediamine dichloride dicampurkan (*dimixture*) menggunakan vortex. Setelah terjadi perubahan warna (ditunggu sampai 30 menit), selanjutnya OD (optical density) diukur dengan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi nitrit dihitung dengan membandingkan kurva standart nitrit.

3.3.8 Penentuan Kandungan Nitrat Jaringan

Kandungan nitrat diukur menurut metode dari Cataldo *et al.* (1975). Sampel sebanyak 50 μL ditambahkan dengan 200 μL 5% (W/V) salicylic acid dalam H_2SO_4 p.a. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit ditambahkan 5 ml. 2N NaOH secara perlahan-lahan. Selanjutnya absorbansi diukur dengan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 410 nm. Konsentrasi nitrat dihitung dengan membandingkan kurva standart nitrat.

3.3.9 Penentuan Aktivitas *Sucrose synthase*

Aktivitas SS ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan dari sukrosa selama proses hidrolisis sukrosa. 500 μL *reaction mixture* SS yang mengandung 25 mM Mops-NaOH (pH 7,0), 100 mM sukrosa dan 2mM UDP ditambah dengan 400 μL H_2O dan 100 μL 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 μL . Selanjutnya dididihkan pada *waterbath* selama 10 menit. Setelah campuran didiamkan pada air sampai dingin, kemudian OD dibaca menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 560 nm. Fruktosa digunakan sebagai standar gula reduksi. Satu unit aktivitas spesifik SS sama dengan μg fruktosa/ μg protein/jam.

3.3.10 Penentuan Aktivitas *Invertase*

Aktivitas *Neutral invertase* (NI) ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan dari sukrosa selama proses hidrolisis sukrosa. 500 μL *reaction mixture NI* yang mengandung 25 mM Mops-NaOH (pH 7,0), 100 mM sukrosa ditambah dengan 400 μL dan 100 μL enzim. Campuran divortex selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Tepat 30 menit, reaksi dihentikan dengan menambah reagen Dinitrosalicylic acid (DNS) sebanyak 500 μL . Selanjutnya dididihkan pada *waterbath* selama 10 menit. Setelah campuran didiamkan pada air sampai dingin, kemudian OD dibaca menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 560 nm. Fruktosa digunakan sebagai standar gula reduksi. Satu unit aktivitas spesifik NI sama dengan μg fruktosa/ μg protein/jam.

3.3.11 Pengukuran Gula Reduksi

Sampel sebanyak 100 μL ditambah dengan 400 μL H_2O dan 500 μL reagent Dinitrosalicylic acid (DNS). Campuran divortex, 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.

3.3.12 Pengukuran Kandungan Sukrosa

Sampel sebanyak 50 μL dimasukkan ke dalam tabung, ditambah dengan 50 μL H_2O dan 70 μL 0.5N NaOH. Selanjutnya homogenat dididihkan selama 10 menit untuk menghancurkan gula reduksi. Setelah dingin ditambah dengan 250 μL 0.1% resorcinol dan 750 μL 30% HCl, kemudian dipanaskan pada suhu 80°C selama 8 menit. Absorbansi kemudian diukur menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 520 nm. Konsentrasi sukrosa dihitung dengan membandingkan kurva standart sukrosa.

3.4 Parameter Penelitian

1. Aktivitas *Nitrat reduktase*
2. Kandungan total protein terlarut
3. Kandungan nitrit dan nitrat jaringan
4. Aktivitas *Sucrose synthase (SS)* dan *Neutral invertase (NI)*
5. Kandungan gula reduksi jaringan
6. Kandungan sukrosa jaringan





V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Penambahan nitrat dapat meningkatkan aktivitas NR daun kedelai pada fase R1 (awal berbunga) yang mengalami cekaman garam .
2. Aktivitas NR tanaman tercekam garam dengan pemberian nitrat pada konsentrasi 0; 2,5; 5 dan 7,5 mM masing-masing turun menjadi 33, 34, 26, dan 41 % dari aktivitas tanaman kontrol.
3. Aktivitas NR tanaman tercekam garam terus meningkat dengan adanya penambahan konsentrasi nitrat yang diberikan yaitu sebesar 1,7; 1,77 dan 2,7 kali dari tanaman yang tidak diberi perlakuan nitrat.

5.2 Saran

Untuk mengetahui pola aktivitas NR tanaman kedelai pada kondisi cekaman garam, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada tiap fase pertumbuhan tanaman kedelai. Selain itu perlu diteliti juga pengaruh penambahan nitrat dengan konsentrasi yang lebih tinggi dengan kombinasi perlakuan garam sehingga dapat diketahui titik optimum penambahan nitrat yang mempengaruhi aktivitas NR pada kondisi cekaman garam.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd. Alla, M.H., T.D. Vuong and J.E. Harper. 1998. *Genotypic differences in dinitrogen fixation response to NaCl stress in intact and grafted soybean*. Crop Sci 38 : 72-77.
- Abd. Alla, M.H. 1992. *Nodulation and nitrogen fixation in faba bean (Vicia faba L.) plants under salt stress*. Symbiosis 12: 311-319.
- Abrol, Y.P. 1990. *Nitrogen in Higher Plant*. 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.
- Allakhverdiev, S.I., A. Sakamoto, Y. Nishiyama, M. Inaba, and N. Murata, 2000, *Ionic and Osmotic Effects of NaCl-Induced Inactivation of Photosystem I and II in Synechococcus sp.*, Plant Physiol 123 : 1047 – 1055.
- Alnopri. 1995. *Aktivitas Nitrat Reduktase sebagai Kriteria Seleksi Tanaman Kopi Berdaya Hasil Tinggi*. Journal Penelitian UNIB. Bengkulu 3: 36-40.
- Anderson, J.W. and J. Beardall. 1992. *Molecular Activities of Plant Cell*. Blackwell Scientific.
- Armstrong, F.B. 1995. *Buku Ajar Biokimia*, terjemahan: R.T. Maulany. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Bekki K., Trinchant JC., J. Rigaut . 1987. *Nitrogen fixation by Medicago sativa nodules and bacteroid under sodium chloride stress*. Physiol. Plant. 71: 61-7.
- Bergersen, F.J., G.L. Tuner, R.R. Gault, D.L. Chase, J. Brockwell. 1985. *The natural abundance of ¹⁵N in an irrigated soybean crop and its use for calculation of nitrogen fixation*. Aust. J. Agric. Res. 36: 411-423.
- Beevers, L., and R.M. Hageman, 1969, *Nitrat Reduction in Higher Plants*, Annu Rev. Plant Physiol 20 : 495 – 522.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem, and R.L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*. American Society of Plant Physiologist, Rockville USA. 10p.

- Campbell, W.H. 1988. *Higher plant Nitrate reductase*; Arriving at a molecular view Pages 1-15 dalam D.H Randall, D.G. Blevins, and W.H. Campbell (eds), *Current topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol 7 University of Missouri, Columbia.
- Cataldo, D.A., M. Haroon, L.E. Scharader and U.L. Youngs. 1975. *Rapid calorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of Salicylic acid*. Soil Science and Plant Analysis, Departemen of Agronomy Univ. of Wisconsin Medions. 5(1) : 71-80.
- Cheng C.L., C. Dewdney, A. Kleinhofs, and H.N. Goodman. 1986. *Cloning N nitrate induction of Nitrate reductase mRNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 6825 – 6826.
- Cheng, C.L., G.N. Acedo, M. Christinsin, M.A Conklyng. 1992. *Sucrose mimics the lights inductions of Arabidopsis Nitrate reductase gene transcription*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 1861 – 1864.
- Cordovilla, M.P., A. Ocana, F. Ligeró, and C. Liuch. 1995. *Salinity effect on growth analysis and nutrient composition in four grain legume- Rhizobium symbiosis*. J. Plant. Nutr. 18:1595-1609.
- Criddle, R.S., L.D Harsen, R.W. Breidenbach, M.L. Ward and Huffaker. 1989. *Effect of NaCl on metabolic heat evolution rates of barley root*. Plant physiol. 90 : 53-58.
- Delgado M.J., F. Ligeró., C. Liuch . 1994. *Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants*. Soil Biology and Biochemistry 26: 371-6.
- Deutcher, M.P. 1990. *Method in enzymology: Guide to protein purification*. Academic Press California, USA.
- Fabre, F. and C. Planchon. 2000. *Nitrogen nutrition, yield and protein content in soybean*. Plant science 152 : 51-58.
- Fehr, W.R. dan C.E. Caviness. 1977. *Stages of soybean development*. Iowa State Univ. Spec. Rpt.80. Coop. Ext. Service, Iowa state University. Ames, IA.
- Ferrario-Mer, S., M.H. Valadier and C.H. Foyer. 1998. *Overexpression of Nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in Nitrate reductase activity and mRNA*. Plant Physiol. 117 : 293 –302.
- Flower, T.J. and A.R. Yeo. 1981. *Variability in the resistance of Sodium Chloride within rice (Oryza sativa L.) varieties*. New Phytol. 88 : 363-373.

- Gordon, A.J., F.R. Minchin, L. Skot and C.L. James. 1997. *Stress induced decline in soybean N_2 fixation are related to nodule Sucrose syntase activity*. Plant Physiol 114 : 937 – 946.
- Georgiev GI, Atkins CA. 1993. *Effects of salinity on N_2 fixation, nitrogen metabolism and eksport and diffusive conductance of cowpea root nodules*. Symbiosis 15 : 239-55.
- Grattan, S.R., and E.V. Mass. 1988. *Effect of salinity on phosphate accumulation and injury in soybean: I. Influence on CaCl/NaCl ratios*. Plant Soil 105 : 25 – 32.
- Guerrero, M.G., J.M. Vega and M. Losand .1981. *The assimilatory nitrate reducing system and its regulation*. Ann Rev. Plant Physiol. 32 : 169
- Handarson, G., F. Zapata, S.K.A. Danso. 1984. *Effect of plant genotype and nitrogen fertilizer on symbiotic nitrogen fixation by soybean cultivars*. Plant Soil 82: 397-405.
- Harper, J.E., dan R. Hageman. 1972. *Canopy and Seasonal Profile of Nitrate Reductase in Soybeans (Glycine Max L. Merr)*. Plant Physiol. 49 : 146 – 154.
- Hayashi, H., and N. Murata, 1998, *Genetically Engineer Enhancement of Salt Tolerance in Higher Plants*. In K Sato, N. Murata, eds, *Stress Respons of Photosynthetic Organisms : Molecular Mechanism and Molecular Regulations*. Elsevier, Amsterdam, pp 133 – 144.
- Heldt, H.W. 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Institute of Plant Biochemistry. Gottingen, Oxford University Press.
- Huber, S.C., J.L. Huber, W. Campbell, dan M.G. Radinbaugh. 1992. *Comparative studies of light nodulation of NR and Sucrose phosphate syntase activities in spinach leaves*. Plant physiol. 33 : 639 – 646.
- Kaiser, W.M., D. Spill, dan J. Glaab. 1993. *Rapid modulation of Nitrate reductase in leaves and roots : In direct evidence for the involvement of protein phosphorylation/dephosphorylation*. Plant Physiol. 89 : 557 – 562.
- Kersie D.B., dan Y. Leshem. 1994. *Stress and cooking in cultivated plant*. Kluwac Academic Publisher, London.
- Lauchli, A. 1984. *Salt exclusion : an adaption of legume for crop and pasture under saline conditions*, P. 171-187 dalam R.C. Staples dan G.H. Toenniessen (ed). *Salinity tolerance in plant: Strategies for crop improvement*. John Willey and Sons, New York.

- Lauchli, A. dan W.J. Wieneke. 1979. *Studies on growth and distribution of Na⁺, K⁺ and C⁺ in soybean varieties differing in salt tolerance*. Pflanzenernahr Bodenkund 142: 3-13.
- Lauter, D.J., D.N. Munns, dan K.L. Clarkin. 1981. *Salt response of chickpea as influence by N supply*. Agron. J. 73 : 961 – 966.
- Lca, P.J. and Leegood. 1993. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Willey and Sons. Ltd, New York. 157p.
- Martino, S.C., and J.R. Smarelli. 1989. *Nitrate Reductase Synthesis in Squash Cotyledones*. Plant Science 61 : 51 – 67.
- Pandiangan, D., A.H. Siregar dan S.N.B. Widiyanto, 1997, *Profil Protein Lini Kalus Padi Kultivate Sei Lilin Hasil Uji Toleransi Terhadap Salinitas*, Eugenic 3 : 209 – 221.
- Papaegeorgiou, G.C., Z.A. Alygizaki, N. Ladas, and N. Murata. 1998. *A Method to probe the cytoplasmic osmolality and osmotic water and solute fluxes across the cell membrane of Cyanobacteria with Chl a Fluorescence : Experiment with Synechococcus sp. PCC 7942*. Plant Physiol. 103 : 215 – 224.
- Rabie and Kumazawa, 1988. *Effect of salinization and desalinization on the uptake, distribution, and asimilation of fertilizer nitrogen by nodulated soybeans*. Soil Sci. Plant Nutr. 34: 493-498.
- Rukmana, R. dan Y. Yuniarsih. 2001. *Kedelai, Budidaya dan Pascapanen*. Kanisius, Yogyakarta.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*, Penerbit ITB, Bandung.
- Sarief, S. 1986. *Ilmu Tanah Pertanian*. Pustaka Buana, Bandung.
- Serraj R., G. Roy, J.J. Drevon. 1994. *Salt stress induced a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion*. Physiologia Plantarum 91: 161-8.
- Sexton, P.J., N.C. Paek², dan R.M. Shible. 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.
- Sivashar, S., S. Rothstein, and A. Oaks. 1997. *Regulation nitrate by nitrogen and carbon metabolics in Maize seedling*. Plant Physiol 114 : 583 – 584.

- Srivastava,H.S. 1980. *Regulation of Nitrate Reductase activity on higher plants*. Phytochemistry 19: 725-733
- Soussi, M., A. Ocana and C. Liuch. 1998. *Effect of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (Cicer arietinum L.)*. J. Exp. Bot. 49: 1329-1337.
- Sugiharto,B., R. Miyata, H. Nakamoto, H. Sasakawa and T. Sugiyana. 1990. *Regulation of expression of carbon, assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf*. Plant Physiol. 75 : 665 – 669.
- Sugiharto,B. 1996. *Transformasi dan Asimilasi Unsur Nitrogen oleh Tanaman*. Jember: Fakultas Pertanian UNEJ
- Talbott,L.D and E. Zeiger. 1998. *The role of sucrose in guard cell osmoregulation*. J.Exp.Bot : 329-337.
- Werry,J., O. Ture, L. Salsac. 1986. *Relationship between growth, nitrogen fixation and asimilation in a legume (Medicago sativa L.)*. Plant Soil 96: 17-29.
- Zahran, H.H., and J.I. Sprent. 1986. *Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of Vicia faba L. plant by R. Leguminosarum*. Planta. 167 : 303 – 309.
- Zapata,F., S.K.A. Danso, G. Handarson, M. Fried. 1987. *Time course of nitrogen fixation in field growth soybean using nitrogen -15 methodology*. Agron. J. 79: 172-176.



Milik UPT Perpustakaan
UNIVERSITAS JEMBER