

PENGARUH PEMBERIAN NITRAT DAN AMONIUM  
TERHADAP AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE DAN KANDUNGAN  
RIBULOSA-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE  
PADA PADI SAWAH

**KARYA ILMIAH TERTULIS  
(SKRIPSI)**

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan  
Pendidikan Program Strata Satu (S1) Program Studi Agronomi  
Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian  
Universitas Jember

Oleh :

**LITA TRISATUTI**

981510101221



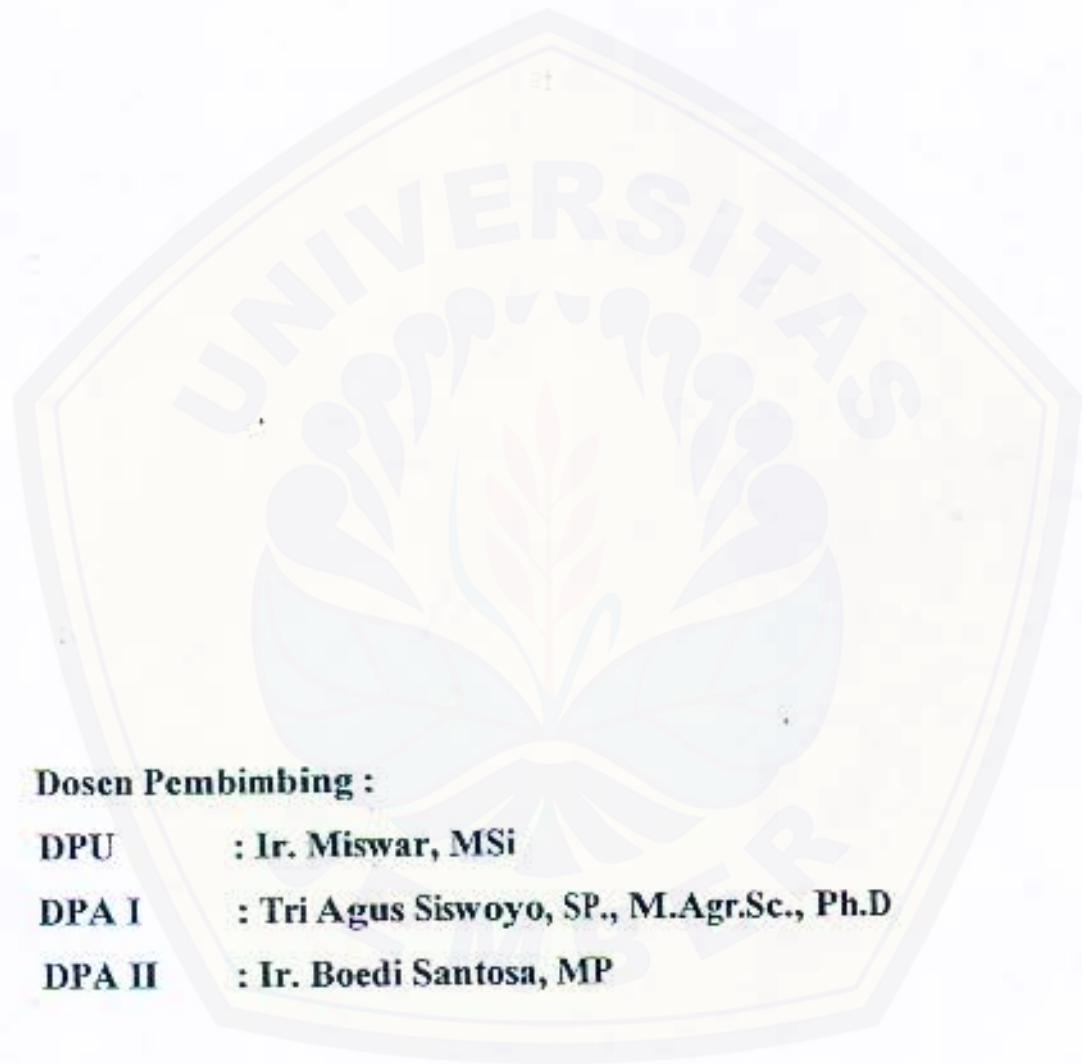
Milik IPT Perpustakaan  
UNIVERSITAS JEMBER

Agg 1 : Harfiah  
Pembelian  
Terin : Tgl. 03 JUN 2003  
No. 1221

Klass  
631.81  
TR1  
P

C.1

**JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN  
FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER  
MARET, 2003**



**Dosen Pembimbing :**

**DPU : Ir. Miswar, MSi**

**DPA I : Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr.Sc., Ph.D**

**DPA II : Ir. Boedi Santosa, MP**

Diterima oleh Fakultas Pertanian  
Universitas Jember sebagai  
Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan pada

Hari : Kamis

Tanggal : 6 Maret 2003

Tempat : Fakultas Pertanian

Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua



Ir. Miswar, Msi  
NIP. 131 880 473

Anggota I



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

Anggota II



Ir. Boedi Santosa, MP  
NIP. 131 658 018

Mengesahkan

Dekan



Ir. H. Ang Mudjiharjati, MS  
NIP. 130 609 808

## MOTTO

Barang siapa yang keluar mencari ilmu maka dia di jalan Allah  
sehingga kembali dia  
(HR. Ibnu Majah)

Barang siapa mencari ilmu selain karena Allah atau menghendaki selain karena  
Allah maka bertempat siapa orang pada tempat duduk dari neraka  
(HR. Termidzi)

Dengan ilmu kehidupan menjadi mudah  
dengan seni kehidupan menjadi indah  
dengan agama kehidupan menjadi tenang dan terarah  
(Plagiat)

Bukan segalanya sulit sehingga kita tidak berani,  
Justru karena kita tidak beranilah segalanya menjadi sulit  
(Plagiat)

"Bahwa sekali seseorang benar-benar memiliki komitmen dalam dirinya sendiri  
untuk memenuhi potensi terbaik sesuai talenta yang dimiliki, maka Tuhan juga  
ikut bergerak mendukungnya"  
(Johan Wolfgang Goethe)

Segala sesuatu yang kita inginkan ....

Selama kita mau mengusahakannya dengan kesungguhan dan keikhlasan  
Maka kita akan mendapatkannya dengan senang dan rasa syukur  
(Trisa '00)

**PERSEMBAHAN**

Karya ilmiah tertulis ini kupersembahkan kepada :

**Allah SWT**

Yang telah memberi rahmat, hidayat dan kesempatan kepadaku untuk menikmati dunia pendidikan

**Dunia ilmu pengetahuan**

Walau hanya setetes air dilautan, semoga bermanfaat

**Bapak Walujono (Alm)**

yang selalu memberikan dorongan semoga ini dapat memenuhi harapan bapak tauladan, masa-masa indah dan nasehat-nasehat bapak selalu dibenakku

**Ibu Nanik Haniwati**

yang selalu mendo'akanku dengan cinta kasih, pengorbanan dan pengertian yang tak pernah putus untuk ananda

**Mas Budi dan Mbak Alfi, Mas Bayu dan Mbak Lilik**

yang selalu memberikan perhatian dan dorongan serta pengorbanan yang tiada terbalas

**Adikku Hadi (Alm), Puji dan Heru**

kalian adalah motivasiku untuk selalu berbuat yang lebih baik (Tetaplah semangat menjalani hidup ini).

**Aldian, Kiki dan Alif**

semoga kalian dapat tumbuh dan berkembang menjadi yang terbaik

**Cucuk Trihidayat dan Ayunda Dianawati**

terimakasih atas segalanya

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufik dan hidayah-Nya serta kesempatan, sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Ilmiah Tertulis yang berjudul " **Pengaruh Pemberian Nitrat dan Amonium terhadap Aktivitas Nitrate Reduktase dan Kandungan Ribulosa-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase pada Padi Sawah**".

Karya Ilmiah Tertulis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu pada Fakultas Pertanian Universitas Jember. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada yang terhormat :

1. Ir. Arie Mudjiharjati, MS selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember
2. Dr.Ir. Sri Hartatik, MS selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember.
3. Dr.Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku Ketua Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember yang memberikan ijin dan dukungan sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.
4. Ir. Miswar, MSi selaku Dosen wali dan Dosen Pembimbing Utama yang dengan kerelaan dan kesabaran memberikan bimbingan selama pendidikan S-1, penyusunan dan penyempurnaan Karya Ilmiah Tertulis ini.
5. Tri Agus Siswoyo, SP.,M.Agr.Sc.,Ph.D selaku Dosen Pembimbing Anggota I dan Ir. Boedi Santosa, MP selaku Dosen Pembimbing II yang dengan kerelaan dan kesabaran memberikan bimbingan selama penyusunan dan penyempurnaan Karya Ilmiah Tertulis ini.
6. Tri Handoyo, SP Dosen Pembimbing Lapangan dan penyanggah dana penelitian, semoga sukses mencari ilmu di negeri Sakura.
7. Seluruh staf dan dosen di Laboratorium Biologi Molekuler.
8. Beasiswa Penunjang Prestasi Akademik (PPA).
9. Seluruh guruku yang telah membimbingku dan memberikan ilmunya.
10. Keluarga besar Drs. Wakidi, Kel Drs. Ichwan Azis, Kel Drs. Aliakip, SU., Drs. Ec. Moh. Yasin (Surabaya), Kel. Hadi Hartono, Ir. Arief Iswanto, MSc.

11. Rekan-rekan di IAA, HIMAGRO dan UKKM Fakultas Pertanian Universitas Jember.
12. Rekan kerjaku di Biomol : Anita (Alhamdulillah jazakillahukhoiroh atas kerjasamanya), Rike, Tria, Trina, Ima, Lina, Roihan, Su'udi, Imel, Niken, Khristin, Fafan, Wandu, Norma dan tak lupa Mbak Arin.
13. Teman dan sahabatku Ayunda, Hesty, Iche'(Rike), Tia, Eva, mbak Tika, Dik Dian & Dik Dwi, Aan, Cucuk, Iswahyudi, Andrianto, Arif, Towi', Ferry, Lukman, Zainudin, Malik, Ikhsan dan seluruh Agro'98 tanpa terkecuali.
14. Semua pihak yang telah membantu kelancaran penyusunan Karya Ilmiah Tertulis ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhirnya kepada pembaca semoga Karya Ilmiah Tertulis ini dapat bermanfaat sebagai sumbangan sederhana bagi dunia pengetahuan.

Jember, Maret 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	<b>Hal</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
DOSEN PEMBIMBING.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
MOTTO.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
ABSTRAK.....	xi
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Intisari Permasalahan.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Kegunaan Penelitian.....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Asimilasi Nitrat.....	4
2.2 Aktivitas Nitrate Reduktase (NR).....	5
2.3 Hubungan Asimilasi Nitrat dengan Aktivitas Nitrate Reduktase (NR).....	5
2.4 <i>Ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</i> (rubisco).....	7
2.5 Hipotesis.....	7
<b>III. METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	8
3.2 Bahan dan Alat.....	8
3.3 Rancangan Penelitian.....	8
3.4 Parameter Penelitian.....	9
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	9



3.5.1	Penanaman .....	9
3.5.2	Ekstraksi dan Analisa Aktivitas Nitrat Reduktase (NR) ..	9
3.5.3	Analisa Kandunga Nitrat dan Kandungan Amonium.....	10
3.5.4	Analisa Kandungan <i>Ribulosa-1,5-bisphosphaterboxylase/</i> <i>oxygenase (rubisco)</i> .....	11
3.5.5	Analisa Kandungan Total Protein Terlarut (TPT).....	11
3.5.6	Analisa Kandungan Klorofil (a+b).....	12
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Hasil Penelitian .....	13
4.1.1	Pengaruh Pemberian Nitrat dan Amonium terhadap Aktivitas NR.....	13
4.1.2	Pengaruh Pemberian Nitrat dan Amonium terhadap Kandungan Nitrat .....	14
4.1.3	Pengaruh Pemberian Nitrat dan Amonium terhadap Kandungan Amonium .....	15
4.1.4	Pengaruh Pemberian Nitrat dan Amonium terhadap Kandungan Rubisco .....	17
4.1.5	Pengaruh Pemberian Nitrat dan Amonium terhadap Kandungan Protein .....	17
4.1.6	Pengaruh Pemberian Nitrat dan Amonium terhadap Kandungan Klorofil.....	18
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan.....	20
5.2	Saran.....	20
	DAFTAR PUSTAKA	
	LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

	<b>Hal</b>
Gambar 1 Hubungan Aktivitas NR dengan Hasil Akhir Fotosintesis.....	6
Gambar 1.1 Hubungan Aktivitas NR dengan Berbagai Konsentrasi Nitrat.....	13
Gambar 1.2 Hubungan Aktivitas NR dengan Berbagai Konsentrasi Amonium.....	13
Gambar 2.1 Hubungan Kandungan Nitrat dengan Berbagai Konsentrasi Nitrat.....	14
Gambar 2.2 Hubungan Kandungan Nitrat dengan Berbagai Konsentrasi Amonium.....	15
Gambar 3.1 Hubungan Kandungan Amonium dengan Berbagai Konsentrasi Nitrat.....	16
Gambar 3.2 Hubungan Kandungan Amonium dengan Berbagai Konsentrasi Amonium.....	16
Gambar 4. Hasil Elektroforesis Kandungan <i>Ribulosa-1,5-bisphosphaterboxylase/ oxygenase</i> (rubisco).....	17
Gambar 5.1 Hubungan Kandungan Protein dengan Berbagai Konsentrasi Nitrat.....	18
Gambar 5.2 Hubungan Kandungan Protein dengan Berbagai Konsentrasi Amonium.....	18
Gambar 6.1 Hubungan Kandungan Klorofil dengan Berbagai Konsentrasi Nitrat.....	19
Gambar 6.2 Hubungan Kandungan Klorofil dengan Berbagai Konsentrasi Amonium.....	19

## ABSTRAK

Lita Trisatuti (98-1221) Jurusan Budidava Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember "PENGARUH PEMBERIAN NITRAT DAN AMONIUM TERHADAP AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE DAN KANDUNGAN RIBULOZA-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE PADA PADI SAWAH" Dosen Pembimbing Ir Miswar, MSi (DPU) dan Tri Agus Siswoyo, SP.,M.Agr.Sc.,Ph.D (DPA).

Ketersediaan karbon dan nitrogen berperan dalam efisiensi penggunaan nitrogen pada tanaman. Senyawa karbon dari udara dalam bentuk  $\text{CO}_2$  diasimilasi oleh *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (rubisco) melalui fotosintesis, sedangkan senyawa nitrogen diserap oleh tanaman dalam bentuk nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) maupun amonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Semakin besar unsur nitrogen yang diserap oleh tanaman semakin meningkat pula unsur karbon yang diperlukan untuk asimilasi nitrogen, lebih lanjut bisa diduga semakin besar fotosintesisnya.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian nitrogen dalam bentuk nitrat dan amonium terhadap aktivitas *nitrate reduktase* (NR) dan kandungan rubisco pada padi sawah. Nitrogen diberikan dalam bentuk nitrat dan amonium dengan konsentrasi antara 0,4 - 12,8 mM.

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa nitrat berpengaruh lebih baik terhadap aktivitas NR dan kandungan rubisco dibanding amonium. Aktivitas NR tertinggi pada pemberian nitrat dengan konsentrasi 6,4 mM.

Kata kunci : Nitrat, Amonium, *Nitrat Reduktase*, *Ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, Padi Sawah

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan tanaman pangan yang produksinya sangat mempengaruhi perekonomian dan kesejahteraan masyarakat. Pemerintah senantiasa mengupayakan kestabilan produksi dan harga beras agar memenuhi permintaan masyarakat (Baharsjah *et al.*, 1988). Swasembada beras merupakan tujuan utama pemerintah untuk mencukupi kebutuhan beras dalam negeri dan sekaligus dapat menurunkan ketergantungan terhadap impor beras.

Pemerintah meningkatkan produksi padi melalui intensifikasi dan ekstensifikasi. Intensifikasi adalah program pemerintah untuk mengefisienkan penggunaan pupuk terutama pupuk yang mengandung nitrogen, fosfat dan kalium. Nitrogen merupakan unsur yang mutlak diperlukan oleh tanaman padi dan paling banyak mendapatkan perhatian untuk diteliti, karena nitrogen merupakan faktor pembatas dalam peningkatan produksi padi dan didalam tanah jumlahnya sangat terbatas (Hakim dkk., 1981).

Pada umumnya nitrogen diserap tanaman dalam bentuk amonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). Tumbuh-tumbuhan yang tidak melakukan fiksasi nitrogen secara langsung dari udara mendapatkan sebagian besar nitrogennya dari dalam tanah dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  (Armstrong, 1995). Menurut Guerrero *et al.*, (1981) bahwa  $\text{NO}_3^-$  diserap dari dalam tanah, kemudian direduksi menjadi amonia. Amonia selanjutnya oleh tanaman diubah menjadi protein, asam amino, asam nukleat dan senyawa esensial lainnya. Nitrat direduksi menjadi ammonia secara enzimatis dengan melibatkan *nitrate reduktase* (NR) dan *nitrite reduktase* (NiR).

Menurut Alnopri (1995) bahwa ada korelasi positif yang sangat nyata antara aktivitas NR dan daya hasil. Hal ini menunjukkan bahwa peran enzim tersebut sangat penting dalam metabolisme tanaman, karena sebagai enzim pertama dalam reduksi  $\text{NO}_3^-$ . *Nitrate Reduktase* sangat menentukan pembentukan protein untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Selain itu, dalam proses pembentukan asam amino, protein dan senyawa-senyawa esensial lainnya dibutuhkan kerangka karbon yang berasal dari proses fotosintesis yang melibatkan *ribulose-1,5-*



bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) (Buchanan et al., 2000). Senyawa karbon diasimilasi dari udara dalam bentuk  $\text{CO}_2$  melalui fotosintesis, sedangkan senyawa nitrogen diserap dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  maupun  $\text{NH}_4^+$ . Nitrat dan amonium dalam tanaman disintesis menjadi asam amino dan lebih lanjut disintesis menjadi protein yang bertindak sebagai enzim pada metabolisme tanaman. Semakin besar unsur nitrogen yang diserap tanaman, semakin meningkat pula unsur karbon yang diperlukan untuk sintesis asam amino, lebih lanjut bisa diduga semakin besar pula fotosintesisnya (Sugiharto et al., 1990).

## 1.2 Intisari Permasalahan

Pemupukan (khususnya pupuk nitrogen) bagi tanaman padi sawah merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan tingkat pertumbuhan dan produksinya. Pertumbuhan dan produksi padi akan optimal jika pemberian nitrogen tepat. Nitrogen diserap oleh tanaman dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$ .

Nitrogen yang diserap oleh tanaman mengalami proses asimilasi. Pada proses reduksi  $\text{NO}_3^-$ , enzim yang berperan adalah NR dan NiR. Pemberian  $\text{NO}_3^-$  mempengaruhi aktivitas NR, sedangkan pemberian  $\text{NH}_4^+$  tidak. Namun ada kemungkinan pemberian  $\text{NH}_4^+$  mempengaruhi aktivitas NR, karena  $\text{NH}_4^+$  pada media mengalami nitrifikasi terlebih dahulu sehingga tanaman akan menyerap nitrogen dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$ . Penelitian tentang pemberian sumber nitrogen yang berbeda  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$  pada tanaman padi diharapkan dapat mempelajari aktivitas NR dan kandungan rubisco khususnya pada tanaman padi sawah.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian nitrogen yang berbeda, yaitu  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$  terhadap aktivitas NR dan kandungan rubisco pada tanaman padi sawah.

#### 1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang bagaimana pengaruh penggunaan unsur nitrogen dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$  terhadap aktivitas NR dan kandungan rubisco pada tanaman padi sawah.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Asimilasi Nitrat

Awal proses asimilasi nitrogen adalah reduksi  $\text{NO}_3^-$  menjadi  $\text{NH}_4^+$  yang secara enzimatik nitrogen tersebut diubah menjadi senyawa-senyawa nitrogen organik. Armstrong (1995) menyatakan bahwa tumbuh-tumbuhan yang memiliki bintil akar dan bersimbiosis dengan bakteri pemfiksasi nitrogen, memperoleh nitrogen dari udara dalam bentuk  $\text{N}_2$ . Tumbuh-tumbuhan yang tidak memiliki kemampuan untuk bersimbiosis dengan bakteri pemfiksasi nitrogen mendapatkan sebagian besar nitrogen dari dalam tanah dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  atau  $\text{NH}_4^+$ . Adanya  $\text{NH}_4^+$  pada media mempengaruhi penyerapan  $\text{NO}_3^-$ , sedangkan keberadaan  $\text{NO}_3^-$  pada media tidak berpengaruh pada penyerapan  $\text{NH}_4^+$  (Abrol, 1990). Tanaman tidak menyerap  $\text{NH}_4^+$  saja walaupun dilakukan pemupukan  $\text{NH}_4^+$  sebagai satu-satunya sumber nitrogen. Pemberian  $\text{NH}_4^+$  sangat menstimulir proses nitrifikasi (Buckman dan Brady, 1990).

Menurut Martino dan Smarelli (1989) bahwa  $\text{NO}_3^-$  dikonversi menjadi asam amino melalui beberapa tahap reduksi. Lea dan Leegood (1999) menyatakan bahwa  $\text{NO}_3^-$  direduksi menjadi ammonia oleh NR (1) dan NiR (2) dengan proses reaksi sebagai berikut:



Asimilasi  $\text{NO}_3^-$  menjadi molekul organik bergantung pada reduksi  $\text{NO}_3^-$  oleh enzim NR dalam jaringan tanaman (Gardner *et al.*, 1991). Huber *et al.* (1992) menyatakan bahwa asimilasi  $\text{NO}_3^-$  terjadi dalam daun tanaman, selain itu  $\text{NO}_3^-$  juga diasimilasi dalam akar yang energinya berasal dari proses respirasi (Anderson dan Beardall, 1991). Dalam daun tanaman semua tahap asimilasi  $\text{NO}_3^-$  dipengaruhi oleh sinar. Begitu juga dengan reduksi  $\text{NO}_3^-$  menjadi nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) yang terjadi didalam sitoplasma dipengaruhi oleh sinar, karena NR diaktifasi bila ada sinar (Sugiharto, 1996).



## 2.2 Aktivitas Nitrate Reduktase

*Nitrate Reduktase* merupakan enzim yang berperan dalam proses asimilasi unsur hara nitrogen dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  dan diregulasi oleh substrat yang ditambahkan pada tingkat ekspresi gennya. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa pemberian  $\text{NO}_3^-$  sebagai sumber nitrogen pada tanaman menyebabkan tanaman mengakumulasi sejumlah  $\text{NO}_3^-$  baik pada daun maupun akarnya dan aktivitas NR menjadi lebih besar (Sugiharto, 1996). *Nitrat reduktase* adalah enzim kunci yang terlibat dalam tahap pertama asimilasi  $\text{NO}_3^-$  pada tanaman (Schutster *et al.*, 1989). Ketersediaan  $\text{NO}_3^-$  dalam jaringan tanaman mempengaruhi aktivitas NR, karena aktivitasnya diinduksi oleh adanya substrat  $\text{NO}_3^-$ . Menurut Huber *et al.* (1992), produk akhir fotosintesis dapat mempengaruhi aktivitas NR (Gambar 1).

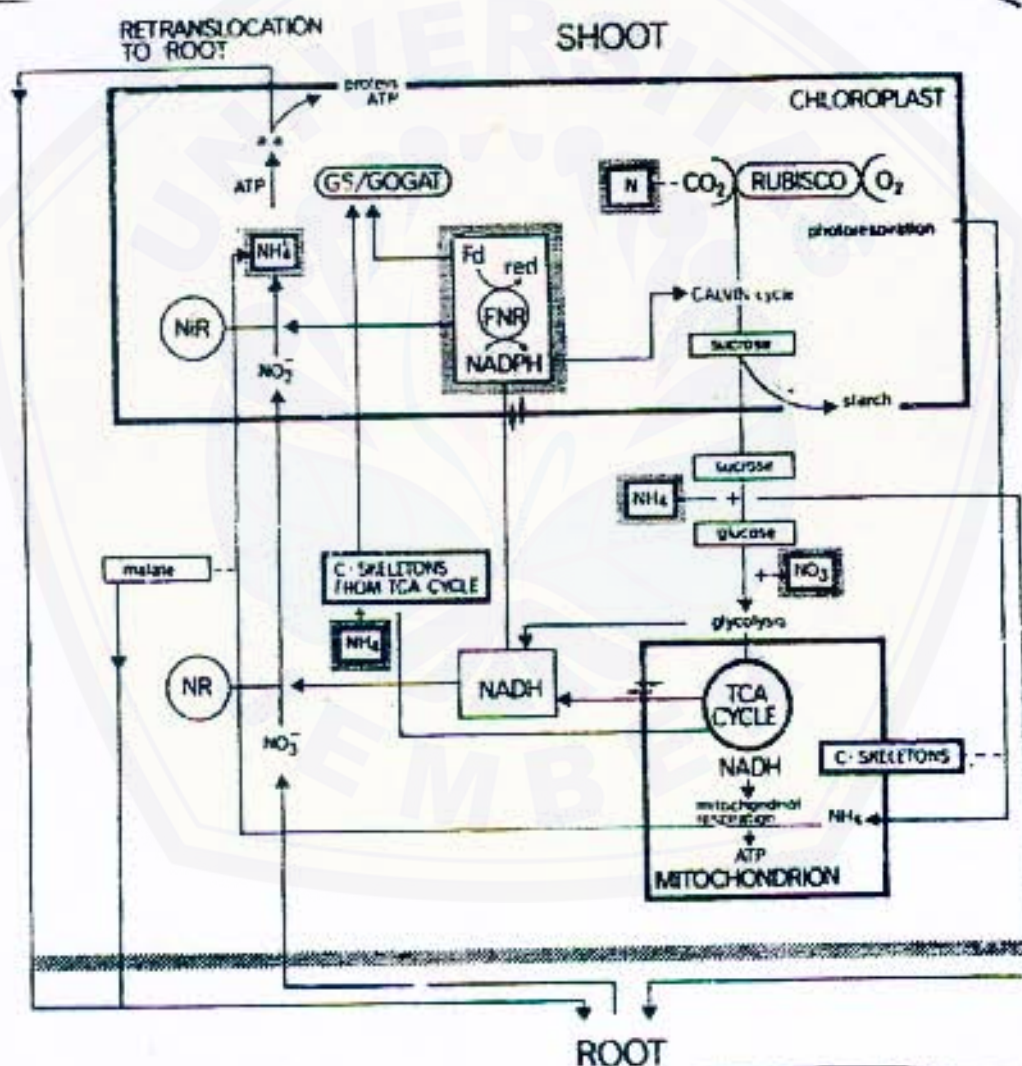
Srivastava dalam Huber *et al.* (1992), mengungkapkan bahwa NR mempunyai aktivitas tertinggi pada daun muda yang sudah berkembang penuh, penambahan umur daun memacu penurunan aktivitas NR. Menurut Alnopri (1995) bahwa relatif kecilnya nilai aktivitas enzim NR daun pada fase vegetatif karena daun belum berkembang secara penuh, sehingga jumlah maupun aktivitas NR-nya masih sangat rendah. Selain itu, karena umur fisiologisnya masih sangat muda sehingga kegiatan fisiobiokimiawinya juga masih sangat rendah.

## 2.3 Hubungan Asimilasi Nitrat dengan Aktivitas Nitrate Reduktase

Menurut Lewis *et al.* (2000), bahwa efisiensi penggunaan nitrogen merupakan sifat kompleks disamping tersedianya nitrogen tanah juga dipengaruhi oleh salah satu faktor internal dan eksternal, seperti fotosintesis fiksasi karbon membentuk prekursor yang digunakan dalam biosintesis asam amino, atau respirasi untuk memperoleh energi. Scheible *et al.* (1997) menyatakan bahwa ketersediaan karbon dan nitrogen berperan dalam efisiensi penggunaan nitrogen. Senyawa karbon diasimilasi dari udara dalam bentuk  $\text{CO}_2$  melalui fotosintesis, sedangkan senyawa nitrogen diserap dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  maupun  $\text{NH}_4^+$ . Baik  $\text{NO}_3^-$  atau  $\text{NH}_4^+$  dalam tanaman disintesis menjadi asam amino yang selanjutnya digunakan untuk membentuk protein enzim yang berperan pada metabolisme



tanaman. Semakin besar unsur nitrogen yang diserap oleh tanaman semakin meningkat unsur karbon yang diperlukan untuk sintesis asam amino, lebih lanjut bisa diduga semakin besar pula fotosintesisnya (Sugiharto *et al.*, 1990). Campbell dalam Salisbury dan Ross (1995) menyatakan bahwa  $\text{NO}_3^-$  yang tinggi disitosol dapat meningkatkan aktivitas NR karena sintesis enzim menjadi lebih cepat. Pemberian  $\text{NH}_4^+$  pada medium tanaman *Sinapis alba* mencegah induksi NR oleh  $\text{NH}_4^+$ , sehingga aktivitas NR tidak mengalami peningkatan.



Gambar 1. Hubungan aktivitas NR dengan produk akhir fotosintesis

#### 2.4 Ribulosa -1,5 - bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)

Senyawa yang mengikat  $\text{CO}_2$  dalam daur calvin adalah senyawa berkarbon-5 yaitu ribulosa-1,5-bisphosphate (RuBp). Ribulosa -1,5 - bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) mengkatalisis proses karboksilasi dari RuBp untuk membentuk 2 phosphate asam gliserat (2PGA). Aktivitas enzim tersebut dipengaruhi oleh keberadaan unsur-unsur hara dalam tanah, antara lain nitrogen dan fosfor. Secara umum nitrogen memegang peranan penting dalam sintesis asam amino maupun protein dalam sel-sel tanaman (Sugiyama *et al.*, 1983). Regulasi aktivitas rubisco dimodulasi oleh laju regenerasi RuBp. Regenerasi ini mungkin disebabkan oleh tingkat fotosintesis dalam kloroplas secara optimal dengan adanya kondisi lingkungan yang bervariasi (Gutteridge *et al.*, 1995).

#### 2.5 Hipotesa

1. Pemberian  $\text{NO}_3^-$  meningkatkan aktivitas NR dan kandungan rubisco.
2. Pemberian  $\text{NO}_3^-$  lebih banyak diserap oleh tanaman daripada  $\text{NH}_4^+$ .

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan rumah kaca Fakultas Pertanian Universitas Jember dengan ketinggian tempat kurang lebih 89 m dpl. Waktu penelitian dilaksanakan bulan Mei sampai September 2002.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman padi sawah varietas IR 64, pasir, nitrogen cair. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk larutan Hougland merupakan senyawa kimia dengan kualifikasi cocok untuk penelitian diproduksi oleh E-merck dan Sigma. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer, mikropipet, timer, neraca digital, cawan conway, alat evaporasi, sentrifuge dan lain-lain.

#### 3.3 Rancangan Penelitian

Padi ditanam pada media pasir dengan komposisi larutan Hougland (*Lampiran 1*) yang diatur konsentrasinya. Perlakuan nitrogen yang diberikan adalah  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$  sebagai berikut :

##### Perlakuan Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ )

N1 =  $\text{NO}_3^-$  0,4 mM

N2 =  $\text{NO}_3^-$  0,8 mM

N3 =  $\text{NO}_3^-$  1,6 mM

N4 =  $\text{NO}_3^-$  3,2 mM

N5 =  $\text{NO}_3^-$  6,4 mM

N6 =  $\text{NO}_3^-$  12,8 mM

##### Perlakuan Amonium ( $\text{NH}_4^+$ )

A1 =  $\text{NH}_4^+$  0,4 mM

A2 =  $\text{NH}_4^+$  0,8 mM

A3 =  $\text{NH}_4^+$  1,6 mM

A4 =  $\text{NH}_4^+$  3,2 mM

A5 =  $\text{NH}_4^+$  6,4 mM

A6 =  $\text{NH}_4^+$  12,8 mM



### 3.4 Parameter Penelitian

1. Aktivitas Enzim NR
2. Kandungan Nitrat
3. Kandungan Amonium
4. Kandungan *Ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (rubisco)
5. Kandungan Total Protein Terlarut (TPT)
6. Kandungan klorofil (a + b)

### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Penanaman

Padi dikedambahkan selama kurang lebih 3 minggu pada media pasir. Bibit dipilih yang pertumbuhannya seragam, kemudian ditanam pada polybag berukuran 30 x 30 cm secara hidroponik pada media pasir dengan nutrisi Hougland. Penanaman dilakukan selama 1 bulan kemudian dilakukan pemanenan daun pada hari ke 1, 5 dan 10 setelah pemberian larutan. Contoh daun untuk analisa aktivitas enzim, adalah daun nomor satu menurut kriteria Kuyper (1955) dalam Marsadi Pawirosemadi (1980), yaitu daun lingkaran pertama yang tampak siku daunnya dan telah berkembang penuh dihitung dari ujung batang tanaman padi. Pada waktu yang sudah ditentukan daun lingkaran pertama diambil pada siang hari (antara jam 10-12 siang). Dibelah sepanjang lamela tengah, beratnya ditimbang dan dimasukkan dalam nitrogen cair untuk analisa enzim.

#### 3.5.2 Ekstraksi dan Analisa Aktivitas Nitrate Reduktase

Dua gram daun padi ditambahkan nitrogen cair dan quarsand digerus halus, ditambahkan 10% *Polivinylpolypyrrolidone* (PVP) dan 100 mM *hidroxymethyl aminomethane (Tris)-HCl*, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM *Ethylene diamine tetraacetid acid* (EDTA) dan  $\beta$ -Mercaptoetanol dengan volume 3 kali berat daun. Hasil gerusan dimasukkan dalam *tube* kemudian disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, dihasilkan supernatan untuk analisa enzim. Sebagian supernatan disimpan dalam lemari pendingin  $-80^{\circ}C$  untuk pengukuran selanjutnya.

Aktivitas NR diuji menggunakan larutan dengan komposisi sebagai berikut : 300  $\mu\text{L}$  50 mM kalium-phosphate (buffer Kpi), 200  $\mu\text{L}$  0,1 M kalium nitrat ( $\text{KNO}_3$ ), 100  $\mu\text{L}$  4 mM nikotinamida dehidrogen (NADH), 200  $\mu\text{L}$  supernatan dan ditambahkan *aquadest* sampai volumenya 2 mL. Tabung reaksi yang berisi komposisi diatas dimasukkan dalam inkubator dengan suhu  $30^\circ\text{C}$ . Pemberian sample 200  $\mu\text{L}$  pada waktu 0 menit, 10 menit dan 20 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan 1000  $\mu\text{L}$  1% Sulfanilamide dalam HCl dan 1000  $\mu\text{L}$  0,2% N-Naphthyl. Aktivitas NR diukur berdasarkan terbentuknya  $\text{NO}_2$  pada proses tersebut dan dideteksi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Satu unit aktivitas spesifik NR sama dengan  $\mu\text{g NO}_2/\mu\text{g protein/jam}$ .

### 3.5.3 Analisa Kandungan Nitrat dan Kandungan Amonium

#### 3.5.3.1 Ekstraksi

Dua gram daun dan quarsand digerus halus ditambahkan 5 mL 96% etanol dimasukkan dalam tabung sentrifuge, divortex dan diinkubasikan pada suhu  $60^\circ\text{C}$  kemudian disentrifuge 12.000 rpm selama 5 menit, supernatan dipisahkan dan peletnya ditambahkan 96% etanol dan seterusnya sampai dihasilkan pelet berwarna putih. Supernatan yang dihasilkan dievaporasi. Hasil evaporasi merupakan sample untuk analisa kandungan  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$ .

#### 3.5.3.2 Analisa Kandungan Nitrat

Lima puluh mikroliter sample ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  5% (W/V) Salicylic acid dalam  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (p.a), diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit, kemudian di tambahkan 5 mL 2N NaOH secara pelan-pelan. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang 410 nm. Besarnya kandungan nitrat dihitung dengan mengkalibrasikan pada standar  $\text{NO}_3^-$  dengan konsentrasi 0 - 6,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 3.5.3.3 Analisa Kandungan Amonium

Kandungan  $\text{NH}_4^+$  dalam jaringan daun padi diukur dengan menggunakan metode cawan Conway (Barry *et al.*, 1985). 500  $\mu\text{L}$  ekstrak daun dicampur dengan 500  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (larutan jenuh pada pH lebih dari 12). Sebelum penyampuran pada bagian pusat cawan Conway, ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  0,01N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan setelah dicampurkan, cawan Conway ditutup rapat. Setelah inkubasi selama 2 jam larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diambil dan diencerkan dengan aquades! sampai total volumenya 2,5 mL. Kemudian ditambahkan reagen nessler sebanyak 500  $\mu\text{L}$ . Setelah terjadi perubahan warna, absorbannya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Besarnya kandungan  $\text{NH}_4^+$  dihitung dengan mengkalibrasikan pada standar  $\text{NH}_4^+$  dengan konsentrasi 0 - 7,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 3.5.4 Analisa Kandungan Rubisco

Dua puluh mikrogram protein dari ekstrak daun tanaman padi dipisahkan menggunakan elektroforesis gel sodium dodesil sulfat poliakrilamida (SDS-PAGE) dengan konsentrasi gel sebesar 12,5%. Gel di *running* dengan elektroda buffer 0,25 M Tris, 1,92 M Glycine, 1% SDS, diukur pH larutan 8,3. Selanjutnya diwarnai (*staining*) dengan larutan pewarna dengan komposisi sebagai berikut : 40% metanol, 10% acetic acid dan 0,1% Coomassie blue R-250. Setelah itu di dicuci dengan larutan pencuci (*destaining*) yaitu 7% asam asetat glasial.

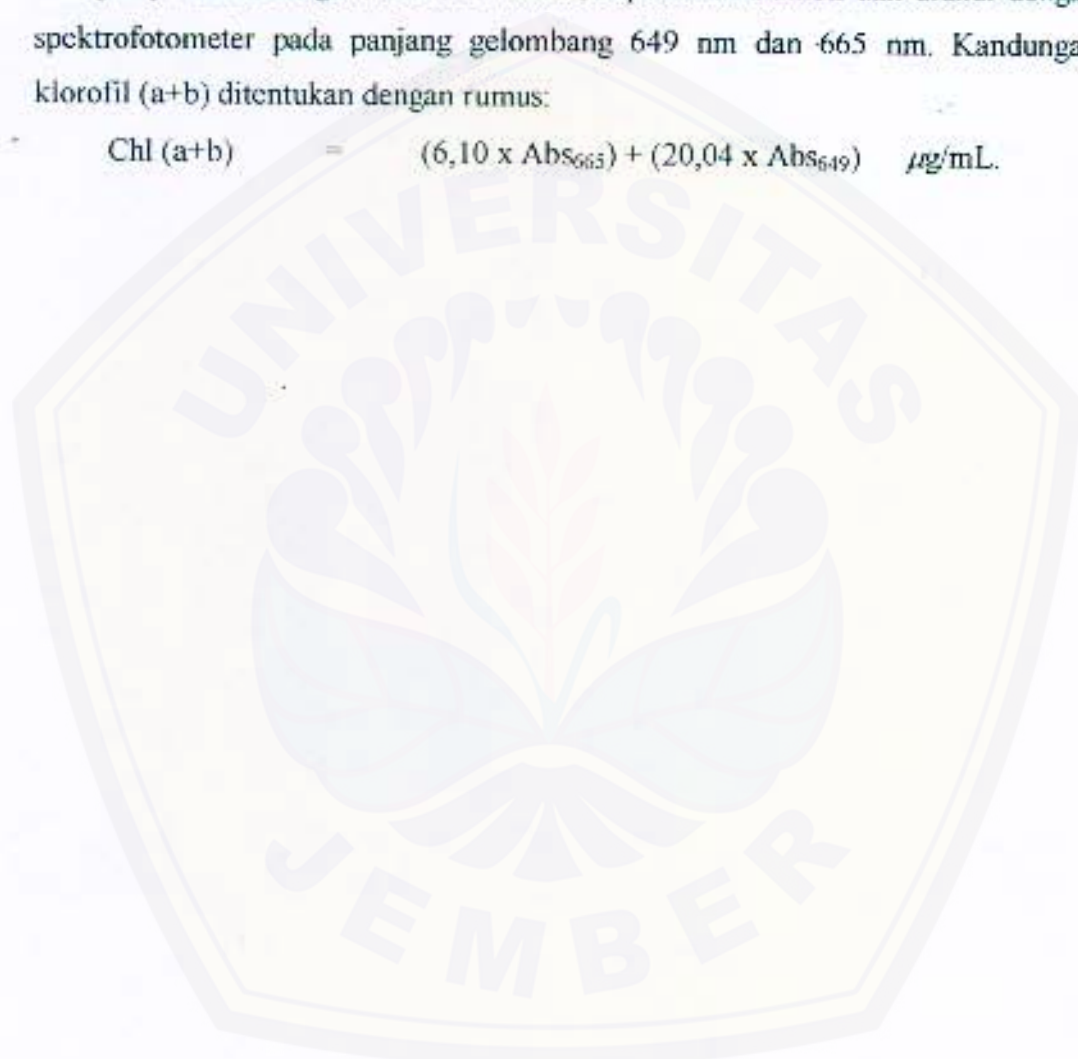
### 3.5.5 Analisa Kandungan TPT

Kandungan protein diukur menggunakan metode Bradford (Stoscheck, 1990) yaitu dengan memasukan 5  $\mu\text{L}$  sampel dalam 1 mL larutan bradford. Kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1 mg/mL.

### 3.5.6 Analisa Kandungan Klorofil (a+b)

Kandungan klorofil (a+b) diukur menurut metode Wintermans dan Demonts, (1965). Dua gram daun padi dan quarsand digerus halus ditambahkan aquadest 3 mL, 100  $\mu$ l. ekstrak daun ditambahkan dengan 1900  $\mu$ l. etanol (p.a), selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit, supernatan diambil dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 649 nm dan 665 nm. Kandungan klorofil (a+b) ditentukan dengan rumus:

$$\text{Chl (a+b)} = (6,10 \times \text{Abs}_{665}) + (20,04 \times \text{Abs}_{649}) \quad \mu\text{g/mL.}$$



## V. KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Aktivitas NR pada pemberian  $\text{NO}_3^-$  lebih tinggi dibanding pemberian  $\text{NH}_4^+$ . Aktivitas NR yang tertinggi pada pemberian  $\text{NO}_3^-$  konsentrasi 6,4 mM yaitu 0,101 unit, sedangkan pemberian  $\text{NH}_4^+$  pada konsentrasi 12,8 mM sebesar 0,047 unit.
2. Aktivitas NR tinggi pada perlakuan  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$  selama 5 hari.
3. Kandungan rubisco lebih tinggi dengan pemberian  $\text{NO}_3^-$  bila dibandingkan dengan  $\text{NH}_4^+$
4. Pemberian nitrogen dalam bentuk  $\text{NO}_3^-$  lebih banyak diserap oleh akar padi daripada  $\text{NH}_4^+$  dilihat dari besarnya aktivitas NR dan kandungan rubisco.

### 5.2 Saran

Pada penelitian ini pemberian  $\text{NH}_4^+$  masih dipengaruhi oleh adanya nitrifikasi, untuk penelitian selanjutnya sebaiknya digunakan penghambat nitrifikasi pada larutan  $\text{NH}_4^+$ .





DAFTAR PUSTAKA

- Abrol, Y.P. 1990. *Nitrogen in Higher Plants*. Research Studies Press LTD. England.
- 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. 1991. *Molecular Activities of Plant Cell, An Introduction to Plant Biochemistry* Blackwell Scientific Publications. London Endiburg.
- Armstrong, F.B. 1995. *Buku Ajar Biokimia*. Terjemahan RT. Maulany. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Baharsjah, S., F. Kasryno dan D.H. Darmawan. 1988. *Kedudukan Padi dalam Perekonomian Indonesia dalam Padi Buku 1*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor.
- Barry, J.S., K.S. Chowics, I.J. Rober, Ireland, and K.W. Joy. 1984. Determination of Urea and Ammonia in Leaf Extracts : Application to Ureide Metabolism. *Can.J Bot.* 63 : 1135-1140.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem and R.L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville. Maryland, USA.
- Buckman, H.O and N.C. Brady. 1990. *Ilmu Tanah*. Bhratara Karya Aksara. Jakarta.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce and R.I. Mitchell. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Terjemahan Herawati Susilo dari *Physiologi of Crop Plant* (1985). Universitas Indonesia Press. Yogyakarta.
- Guerrero, M.G., J.M. Vega and M. Losada .1981. The Assimilatory Nitrate Reducing System and Its Regulation . *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32 : 169 – 201.
- Hakim, L., S. Moersidi dan Sudjadi. 1981. *Perbandingan Berbagai Pupuk Nitrogen Pada Tanaman Padi Sawah dan Padi Gogo*. Pusat Penelitian Cipayung. Bogor.
- Huber, S.C., J.L. Huber, W.H. Chambell and M.G. Radinbaugh. 1992. Apparent Dependence of The Light Activation of Nitrate Reductase and Sucrose Phosphate Synthase Activities in Spinach Leaves on Protein Syntesia. *Plant Cell Physiology.* 33 : 639 – 646.

- Lea, P.J. and R.C. Leegood. 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Willey & Sons. England.
- Lewis, CE., G. Noctor, D. Causton and C. Fuyer. 2000. Regulation of maize root nitrate reductase mRNA levels. *Physiol Planta*. 85 : 561 – 566.
- Martino, S.J and J.R. Smarelli. 1989. Nitrate Reduktase Synthesis in Squash Cotyledones. *Plant Science*. 61: 51 – 67.
- Pawirosemadi, M. 1989. *Petunjuk Tehnis Cara Menggunakan Nomograf Analisis Tanah Untuk Menetapkan Dosis Pupuk*. P3GI Pasuruan.
- Salisbury, F.B and C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. D.R. Lukman dan Sumaryono (Terjemahan). ITB. Bandung.
- Scheible, W.R., F.A. Gonzales, M. Lauerer, R.B. Muler, M. Caboche, and M. Stitt. 1997. Nitrate acts as signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*. 9 : 783-798.
- Schuster, C., H.Schmidt, and Morh. 1989. *Effect of Nitrate Ammonium , Light Plastidic Factor on the Apparence of Multiple form of Nitrat Reduktase in Mustrate*. *Sinapsis albo Cotyledone Planta*. 74 – 84.
- Sugiharto, B. 1996. *Transformasi dan Asimilasi Unsur Nitrogen oleh Tanaman*. Fakultas Pertanian Universitas Jember. Jember.
- Sugiharto, B., R. Miyata, H. Nakamoto., H. Sasakawa and T. Sugiyama. 1990. Regulation of Expression of Carbon Asimilating Enzymes by Nitrogen in Maize Leaf. *Plant Physiol*. 75 : 665 – 669.
- Sugiyama, T and Y. Hirayama. 1983. Correlation of The Activities of Phosphoenol Pyruvate Carboxylase and Pyruvate Orthophosphate Dikinase With Biomassa In Maize Seedling. *Plant Cell Physiol*. 24 : 783 – 787.
- Stoscheck, C. M. 1990. *Quantition of Protein*. in Deutcher, M. P. 1990. *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. Academic Press California. USA.
- Wintermans, J.P.G.M and Demonts. 1965. Spectrophotometric Characteristics of Chlorophylls a and b and their Pheophytin in Ethanol. *Biochim. Biophys. Acta*. 109 : 448 – 453.

LAMPIRAN 1

Tabel 1. Komposisi larutan hara Hougland dan Arnold (pH 6,5) dalam 1 liter larutan Nitrat (mM) dibutuhkan (ml) :

Larutan induk	0,4 mM	0,8 mM	1,6 mM	3,2 mM	6,4 mM	12,8 mM
I	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16
II	3,9	3,8	3,6	3,2	2,42	0,8
III	2,0	1,9	1,8	1,6	1,23	0,4
IV	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
V	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Tabel 2. Komposisi larutan hara Hougland dan Arnold (pH 6,5) dalam 1 liter larutan Amonium (mM) dibutuhkan (ml):

Larutan induk	0,4 mM	0,8 mM	1,6 mM	3,2 mM	6,4 mM	12,8 mM
I	0,8	1,6	3,2	6,4	12,8	25,6
II	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
III	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
IV	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
V	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

**Komposisi larutan Hougland dan Arnold**

Larutan I : 50,6 gram  $KNO_3$  dan 35,5 gram  $Ca(KNO_3)$  dalam 1 liter  
26,73 gram  $NH_4Cl$  dalam 1 liter

Larutan II : 37,3 gram  $KCl$  dalam 200 ml

Larutan III : 22,1 gram  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  dalam 100ml

Larutan IV : 24,7 gram  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  dalam 100 ml

Larutan V : 15,6 gram  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  ; 12 mg  $Fe-EDTA$  ; 7 mg  
 $MnSO_4 \cdot 6H_2O$  ; 10 mg  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  dalam 100 ml

Setelah masing-masing larutan induk ditambahkan pada setiap liter larutan hara, kemudian diatur pH 6,5 dengan menambahkan  $KOH$ .

## LAMPIRAN 2

Data pengamatan aktivitas NR, kandungan protein, kandungan klorofil, kandungan amonium dan kandungan nitrat pada tanaman padi sawah dengan pemberian amonium dan nitrat pada hari ke-1, 5 dan 10

Perlakuan	Aktivitas NR (unit)			TPT ( $\mu$ g prot./ $\mu$ l)			Kand. Klorofil (mg/gBS)			Kand. Amonium (mgNH <sub>4</sub> /gBS)			Kand. Nitrat (mgNO <sub>3</sub> /gBS)		
	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10
NO <sub>3</sub> 0,4	0,003	0,049	0,017	3,796	3,518	4,347	0,474	0,818	0,573	0,472	0,326	0,346	5,349	3,221	7,657
NO <sub>3</sub> 0,8	0,006	0,052	0,012	3,907	3,062	5,724	0,579	1,318	0,399	0,434	0,588	0,265	5,096	2,770	3,715
NO <sub>3</sub> 1,6	0,012	0,046	0,009	2,751	2,574	7,428	0,412	1,137	0,380	0,716	0,699	0,915	5,922	2,360	4,560
NO <sub>3</sub> 3,2	0,041	0,052	0,016	2,629	2,535	5,506	0,655	1,406	0,692	0,301	0,527	0,727	6,213	1,544	4,993
NO <sub>3</sub> 6,4	0,018	0,101	0,025	3,613	3,043	6,252	0,252	0,899	0,582	0,201	0,985	0,525	8,253	1,439	5,881
NO <sub>3</sub> 12,8	0,02	0,069	0,02	3,760	3,713	7,182	0,506	1,143	0,199	0,307	0,517	0,379	7,849	1,601	9,952
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0,4	0,007	0,03	0,011	2,589	3,778	5,294	0,412	1,125	0,207	1,066	0,135	0,557	5,943	2,139	6,855
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0,8	0,002	0,031	0,009	3,030	3,953	5,449	0,431	1,356	0,454	0,340	0,100	0,339	6,415	4,377	4,668
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 1,6	0,006	0,03	0,015	3,973	2,665	3,165	0,388	1,371	0,264	1,141	0,076	0,423	4,182	2,324	4,949
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 3,2	0,004	0,038	0,012	3,573	4,298	6,505	0,365	0,964	0,839	1,570	0,536	0,416	0,371	1,321	7,288
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 6,4	0,009	0,032	0,016	3,776	4,858	7,520	0,453	1,370	0,556	1,468	0,596	0,406	3,485	1,796	5,816
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 12,8	0,004	0,047	0,021	2,903	3,589	5,082	0,683	1,737	0,918	3,868	0,690	0,387	4,629	1,823	6,054