



**PENGARUH NITROGEN DAN MOLIBDENUM TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM ASIMILASI NITROGEN, PERTUMBUHAN
DAN HASIL PADA TANAMAN PADI HITAM
(*Oryza sativa* L.)**

TESIS

Oleh
Ari Istanti, S. P.
NIM 151520101007

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**PENGARUH NITROGEN DAN MOLIBDENUM TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM ASIMILASI NITROGEN, PERTUMBUHAN
DAN HASIL PADA TANAMAN PADI HITAM
(*Oryza sativa* L.)**

*Effect of Nitrogen and Molybdenum on Nitrogen Assimilation Enzyme Activity,
Growth and Yield of Black Rice (*Oryza sativa* L.)*

TESIS

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan program (S2) pada Program Studi Magister Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember

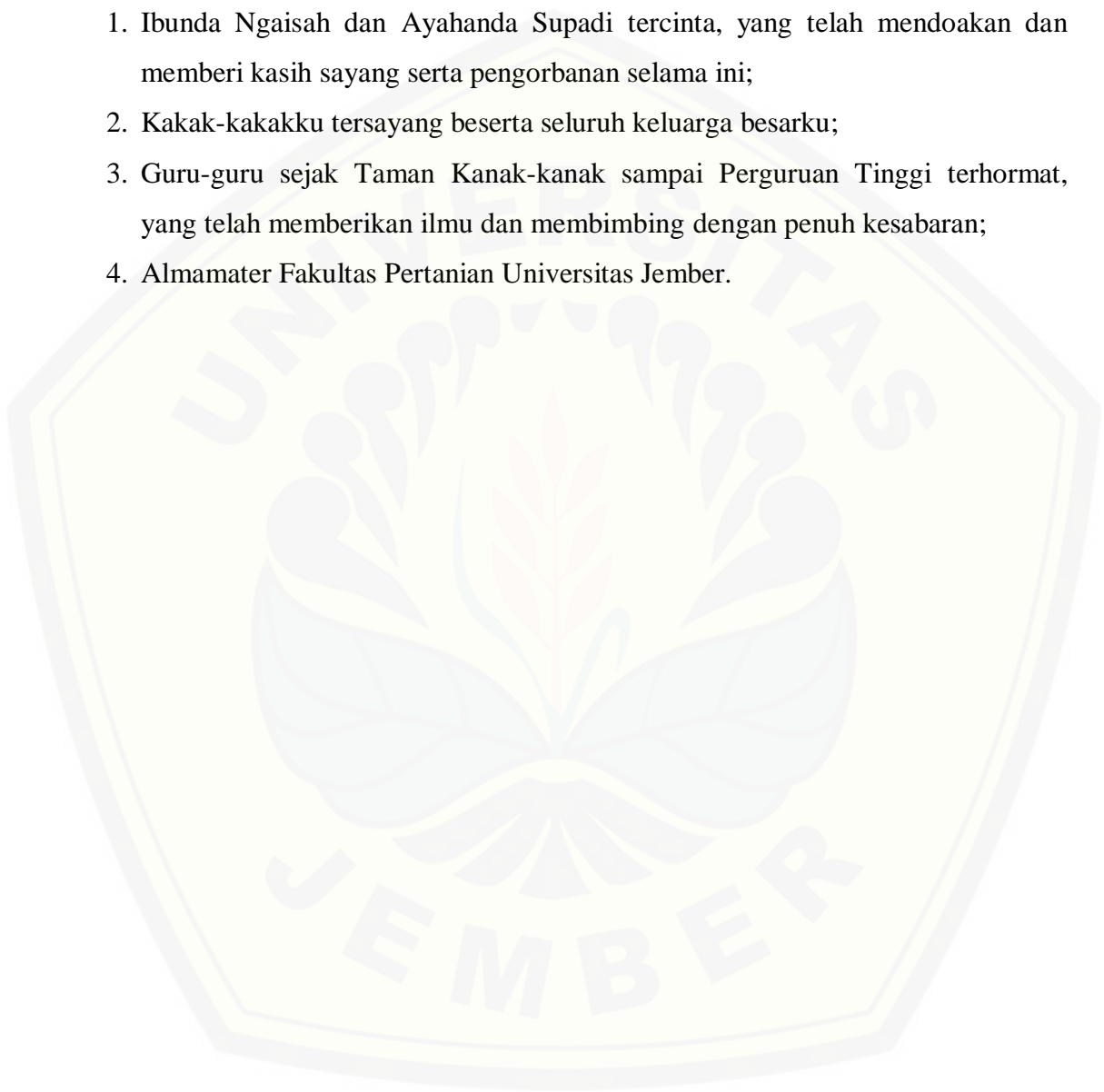
Oleh
Ari Istanti, S. P.
NIM 151520101007

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Dengan segala kerendahan hati dan puji syukur yang tak terhingga pada Allah SWT, tesis ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Ngaisah dan Ayahanda Supadi tercinta, yang telah mendoakan dan memberi kasih sayang serta pengorbanan selama ini;
2. Kakak-kakakku tersayang beserta seluruh keluarga besarku;
3. Guru-guru sejak Taman Kanak-kanak sampai Perguruan Tinggi terhormat, yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.



MOTTO

Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu; Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.

(QS. Al Baqarah 2:216)

Dream, believe, and make it happen

(Agnes Monica)

It's okay to be scared. Being scared means you're about to do something really, really brave

(Mandy Hale)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ari Istanti

NIM : 151520101007

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa tesis yang berjudul: **“Pengaruh Nitrogen dan Molibdenum Terhadap Aktivitas Enzim Asimilasi Nitrogen, Pertumbuhan, dan Hasil Pada Tanaman Padi Hitam (*Oryza sativa* L.)”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 September 2017

Yang menyatakan,

Ari Istanti, S. P.

NIM 151520101007

TESIS

**PENGARUH NITROGEN DAN MOLIBDENUM TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM ASIMILASI NITROGEN, PERTUMBUHAN
DAN HASIL PADA TANAMAN PADI HITAM
(*Oryza sativa* L.)**

Oleh :
Ari Istanti, S. P.
NIM 101510501145

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Tri Handoyo, SP., M. Agr., Ph.D
NIP. 1957112021998021001

Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph. D
NIP. 196504261994031001

PENGESAHAN

Tesis berjudul “**Pengaruh Nitrogen dan Molibdenum Terhadap Aktivitas Enzim Asimilasi Nitrogen, Pertumbuhan, dan Hasil Pada Tanaman Padi Hitam (*Oryza sativa L.*)**” telah diuji dan disahkan pada :

Hari : Jumat

Tanggal : 06 Oktober 2017

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Tri Handoyo, SP., M. Agr., Ph.D
NIP. 1957112021998021001

Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph. D
NIP.196504261994031001

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, M. S.
NIP. 196003171983032001

Dr. Ir. Denna Eriani Munandar, M. P.
NIP. 196004091988022001

Mengesahkan

Dekan,

Ir. Sigit Soepardjono, M. S., Ph. D
NIP. 196005061987021001

RINGKASAN

Pengaruh Nitrogen dan Molibdenum Terhadap Aktivitas Enzim Asimilasi Nitrogen, Pertumbuhan, dan Hasil Pada Tanaman Padi Hitam (*Oryza sativa* L.); Ari Istanti, S. P, 151520101007. Program Studi Magister Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Padi hitam merupakan varietas lokal yang berpotensi untuk dikembangkan. Salah satu upaya untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas padi hitam adalah dengan pemupukan. Nitrogen merupakan unsur hara makro yang dibutuhkan oleh semua jenis tanaman termasuk tanaman padi hitam. Tanaman padi hitam membutuhkan N selama masa vegetatif untuk memicu pertumbuhan dan pembentukan anakan yang dapat menentukan potensi jumlah malai tanaman. Nitrogen juga berperan dalam pengisian biji, meningkatkan kapasitas fotosintesis, dan memicu akumulasi karbohidrat di batang dan pelepah daun. Pemberian urea sebagai sumber nitrogen untuk tanaman padi hitam harus diberikan secara tepat agar dapat menunjang pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara optimal. Aplikasi urea yang berlebihan dan kontinu menyebabkan menyebabkan perubahan pH tanah menjadi lebih masam hingga 5.5. Pemasaman tanah menyebabkan akumulasi Al, Mn, dan Fe menjadi berlimpah sedangkan sebagian besar unsur hara tidak tersedia bagi tanaman termasuk unsur mikro molibdenum. Kebutuhan tanaman padi akan molibdenum hanya sekitar 0,01 ppm, akan tetapi defisiensi molibdenum dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan pada tanaman padi. Hal ini disebabkan terhambatnya peran molibdenum dalam membantu proses asimilasi nitrogen dalam tanaman. Molibdenum merupakan kofaktor dari enzim nitrat reduktase yang merupakan enzim kunci yang mengasimilasi nitrogen di dalam tubuh tanaman. Nitrat yang diserap oleh tanaman padi akan direduksi di bagian situs aktif yang mengandung molibdenum (kofaktor) menjadi nitrit. Nitrit selanjutnya akan direduksi menjadi ammonium hingga akhirnya menghasilkan glutamate yang berperan sebagai prekursor pembentuk klorofil dan asam-asam amino. Upaya untuk mengembalikan ketersediaan unsur molibdenum dapat dilakukan dengan pengapuran untuk menaikkan pH tanah. Akan tetapi pengapuran membutuhkan waktu hingga beberapa bulan agar unsur hara menjadi tersedia kembali bagi tanaman. Sehingga lebih menguntungkan apabila molibdenum diaplikasikan secara langsung pada lahan atau tanaman. Aplikasi nitrogen dan molibdenum pada tanaman padi hitam akan mempengaruhi aktivitas enzim nitrat reduktase yang berperan dalam asimilasi nitrogen dan sangat berpotensi menentukan pertumbuhan dan hasil tanaman padi hitam. Penelitian tentang pemupukan nitrogen dan molibdenum pada tanaman padi sudah banyak dilakukan, akan tetapi hanya sedikit penelitian yang menggunakan tanaman padi hitam sebagai tanaman model. Percobaan ini bertujuan untuk : 1) Menentukan taraf optimum nitrogen dan molibdenum terhadap aktivitas enzim nitrat reduktase pada tanaman padi hitam; 2) Menentukan taraf terbaik nitrogen dan molibdenum terhadap beberapa variabel pertumbuhan dan hasil pada tanaman padi hitam.

Percobaan ini dilaksanakan pada bulan Februari 2017 sampai dengan Agustus 2017 bertempat di *Green House* Gedung CDAST dan Laboratorium CDAST Universitas Jember. Percobaan disusun menggunakan RAL faktorial 4 x 4 dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah nitrogen : N0 (0,4 mM), N1 (3,2 mM), N2 (6,4 mM), dan N3 (12,8 mM). Faktor kedua adalah molibdenum : M0 (0 mg/l), M1 (0,01 mg/l), M2 (0,02 mg/l), M3 (0,03 mg/l). Variabel pengamatan terdiri atas : 1) aktivitas enzim nitrat reduktase, 2) kandungan sukrosa, 3) kandungan gula reduksi, 4) kandungan klorofil total, 5) laju pertumbuhan, 6) jumlah anakan, 7) jumlah malai, 8) panjang malai, 9) berat segar, dan 10) berat gabah.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa taraf optimum nitrogen terhadap aktivitas NR selama 1 jam adalah 12,4 mM sebesar 2,824 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M0); 10,022 mM sebesar 2,946 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M1); 9,562 mM sebesar 3,009 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M2); dan 10,239 mM sebesar 3,022 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M3). Taraf optimum molibdenum terhadap aktivitas NR selama 1 jam adalah 0,012 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 0,728 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N0); 0,019 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2,328 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N1); 0,017 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2,545 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N2); dan 0,008 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2,725 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N3). Taraf optimum nitrogen terhadap aktivitas NR selama 2 jam adalah 9,711 mM sebesar 2,542 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M0); 10,646 mM sebesar 3,07 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M1); 9,7 mM sebesar 3,199 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M2); dan 12,618 mM sebesar 3,036 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M3). Taraf optimum molibdenum terhadap aktivitas NR selama 2 jam adalah 0,0126 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 0,528 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N0); 0,019 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2,128 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N1); 0,012 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2,696 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N2); dan 0,022 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 3,068 mM nitrit $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N3). Taraf terbaik nitrogen dan molibdenum terhadap pertumbuhan tanaman padi hitam terdapat pada perlakuan N2M1. Taraf terbaik nitrogen dan molibdenum terhadap hasil tanaman padi hitam terdapat pada perlakuan N1M1, N1M2, dan N1M3.

SUMMARY

Effect of Nitrogen and Molybdenum on Nitrogen Assimilation Enzyme Activity, Growth and Yield of Black Rice (*Oryza sativa L.*); Ari Istanti, S. P, 151520101007. Study Program of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Black rice was the local variety which potential to be cultivated. One way to increase yield and quality of black rice was by fertilization. Nitrogen was a macronutrient required by all plants included black rice. Black rice needed N during the vegetative period to triggered the growth and formed tillers. These could be determined the potential number of the panicle. Nitrogen also played a role in grain filling, increased photosynthetic capacity, and triggers carbohydrate accumulation in stem and leaf midrib. Urea application as nitrogen source of black rice should be given appropriately to support growth and development optimally. Excessive urea application and continuously caused changed of soil pH became acid until 5,5. Soil acidification caused the accumulation of Al, Mn, and Fe to be abundant whereas most of the nutrients were not available for plant included micronutrient molybdenum. Rice only needed 0,01 ppm of molybdenum, but molybdenum deficiency could cause disruption of growth and development of rice. This was caused by the inhibition of molybdenum roled in nitrogen assimilation process in plants. Nitrate absorbed by rice would be reduced in active site contained molybdenum (cofactor) became nitrite. Nitrite would reduce became ammonium until formed glutamate which acted as a precursor of chlorophyll and amino acids. A way to returned molybdenum availability was by liming to raise the soil pH. But liming taked times until several months to make molybdenum became available again for plant. So it would be more advantaged if molybdenum applied to farm or plant directly. Nitrogen and molybdenum application of black rice would influence nitrate reductase enzyme activity which roled in nitrogen assimilation process and very potential determined growth and yield of black rice. Research about nitrogen and molybdenum fertilization were many did, but only a few used black rice as a plant model. This experiment aimed to : 1) determined the optimum level of nitrogen and molybdenum on nitrate reductase enzyme activity 2) determined the best level of nitrogen and molybdenum on some growth and yield variables of black rice.

This experiment was conducted on February 2017 until August 2017 at Green House of CDAST Building and CDAST Laboratory in University of Jember. This experiment was arranged in Completely Randomized Design (CRD) with two factors and 3 replications. The first factors was nitrogen : N0 (0.4 mM), N1 (3.2 mM), N2 (6.4 mM), and N3 (12.8 mM). The second factor was molybdenum : M0 (0 mg/l), M1 (0.01 mg/l), M2 (0.02 mg/l), and M3 (0.03 mg/l). Measured variables consisted of : 1) nitrate reductase enzyme activity, 2) sucrose content, 3) reducing sugar content, 4) total chlorophyll content, 5) growth rate, 6)

number of tillers, 7) number of panicles, 8) panicle length, 9) fresh weight, and 10) grain weight.

The result showed that the optimum level of nitrogen on NR activity in 1 hour was 12.4 mM (2.824 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for M0); 10.022 mM (2.946 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for M1); 9,562 mM (3,009 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for M2); and 10,239 mM (3,022 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for M3). The optimum level of molybdenum on NR activity for 1 hour was 0.012 mg·L⁻¹ (0.728 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for N0); 0.019 mg·L⁻¹ (2,328 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for N1); 0.017 mg·L⁻¹ (2,545 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for N2); and 0.008 mg·L⁻¹ (2,725 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for N3). The optimum level of nitrogen on NR activity in 2 hours was 9,711 mM (2,542 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for M0); 10,646 mM (3,070 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for M1); 9,7 mM (3,199 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for M2); and 12,618 mM (3,036 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for M3). The optimum level of molybdenum on NR activity in 2 hours was 0,0126 mg·L⁻¹ (0,528 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for N0); 0,019 mg·L⁻¹ (2,128 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for N1); 0,012 mg·L⁻¹ (2,696 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for N2); and 0,022 mg·L⁻¹ (3,068 mM nitrite· $\mu\text{g protein}^{-1}$ for N3). The best level of nitrogen and molybdenum on growth was N2M1 treatment. The best level of nitrogen and molybdenum on yield was N1M1, N1M2, and N1M3 treatments.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sholawat serta salam semoga tetap tercurah kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“Pengaruh Nitrogen dan Molibdenum Terhadap Aktivitas Enzim Asimilasi Nitrogen, Pertumbuhan, dan Hasil Pada Tanaman Padi Hitam (*Oryza sativa* L.)”**. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan magister (S2) pada Program Studi Magister Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak baik berupa motivasi, nasehat, tenaga, pikiran, materi, dan saran maupun kritik yang membangun. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ir. Sigit Soeparjono, M.S, Ph.D selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember;
2. Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, M.S selaku Ketua Program Studi Magister Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
3. Tri Handoyo, SP., M. Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama, Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph. D selaku Dosen Pembimbing Anggota, Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik selaku Dosen Penguji 1, dan Dr. Ir. Denna Eriani Munandar, M.P. selaku Dosen Penguji 2 yang telah membimbing penulis dan memberikan saran untuk menyusun tesis yang baik;
4. Seluruh Bapak dan Ibu dosen beserta staf karyawan di lingkungan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
5. Ibunda Ngaisah dan Ayahanda Supadi, terimakasih yang tak terhingga ananda ucapkan atas doa, dukungan, kasih sayang, kerja keras, kesabaran dan pengorbanan selama ini;
6. Sahabat-sahabatku tersayang Magister Agronomi 2015, TH Team, Bapak Juliono, Mbak Firoh, Denti, dan teman-teman Laboratorium CDAST,

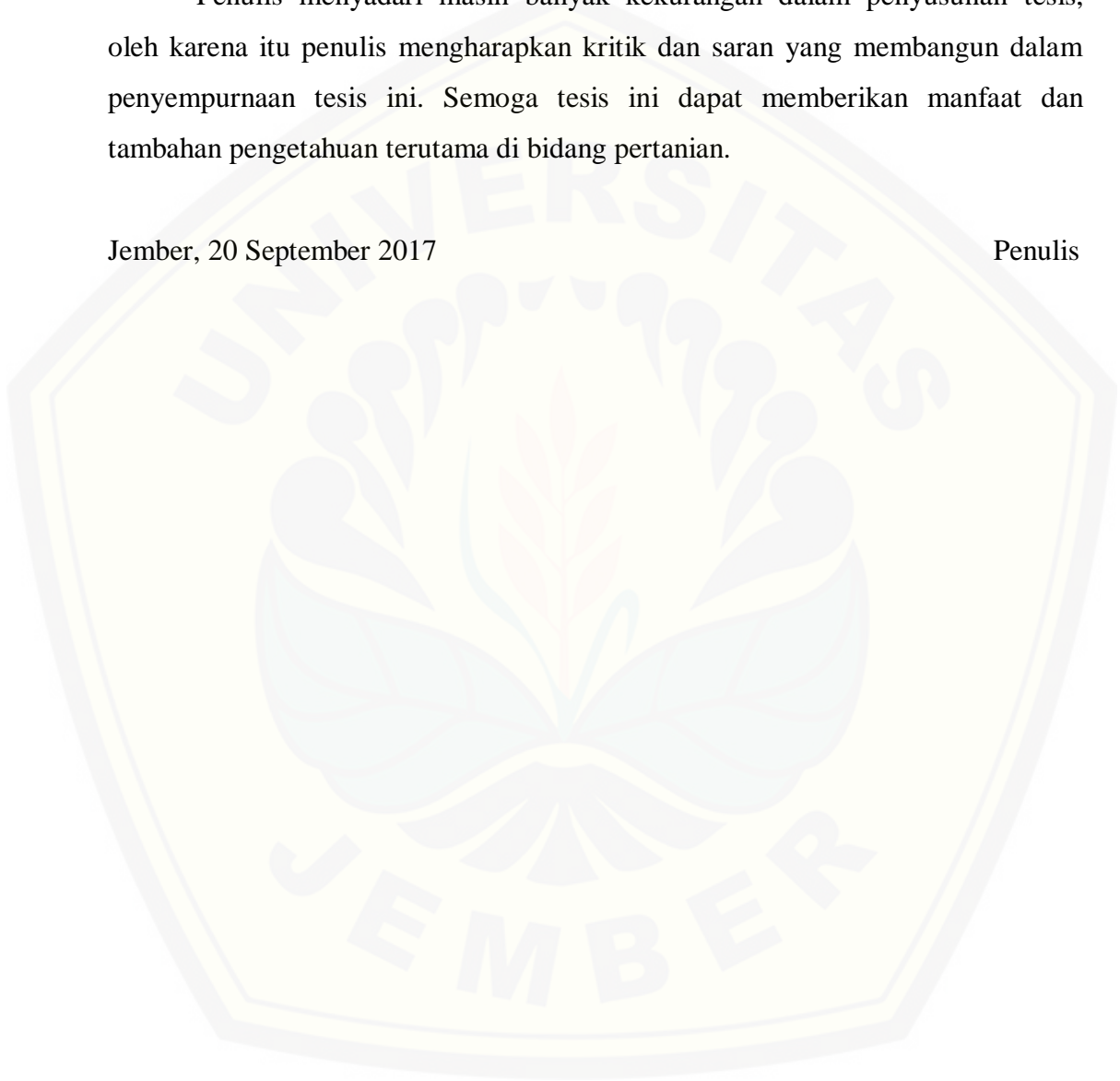
terimakasih untuk semua cerita dan kenangan bersama, baik canda tawa maupun keluh kesah serta semangat yang sudah diberikan.

7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang memberikan bantuan dan dorongan selama mengikuti studi dan penulisan tesis ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan tesis, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dalam penyempurnaan tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat dan tambahan pengetahuan terutama di bidang pertanian.

Jember, 20 September 2017

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Manfaat.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Padi Hitam.....	6
2.2 Pengaruh Nitrogen pada Tanaman Padi.....	8
2.3 Peran Molibdenum (Mo) pada Tanaman Padi.....	12
2.4 Asimilasi Nitrogen.....	16
2.5 Nitrat Reduktase (NR) dan Nitrit Resuktase (NiR).....	18
2.6 Gluthamine Synthetase (GS) dan Glutamate Synthase (GOGAT) ...	25
2.7 Hipotesis.....	29

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	30
3.2 Bahan dan Alat	30
3.3 Rancangan Percobaan	30
3.5 Pelaksanaan Percobaan	32
3.5.1 Persiapan Bibit Tanaman Padi.....	32
3.5.2 Pindahkan dan Pemeliharaan Tanaman.....	32
3.5.3 Pemanenan.....	33
3.6 Pengumpulan Data	33

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil	37
4.1.1 Aktivitas Nitrat Reduktase.....	38
4.1.2 Kandungan Sukrosa.....	40
4.1.3 Kandungan Gula Reduksi	40
4.1.4 Kandungan Klorofil Total	41
4.1.5 Laju Pertumbuhan	42
4.1.6 Jumlah Anakan	43
4.1.7 Jumlah Malai	43
4.1.8 Panjang Malai	44
4.1.9 Berat Segar.....	44
4.1.10 Berat Gabah	45
4.2 Pembahasan	46

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran	52

DAFTAR PUSTAKA	53
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN	61
-----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Karakteristik dan Deskripsi Padi Hitam Bantul	8
3.1 Penentuan Sumber Keragaman dan Rumus Ekspektasi Kuadrat Tengah Model Random	31
4.1 Rangkuman Kuadrat Tengah (Varian) Semua Variabel Pengamatan	37
4.2 Rata-Rata Kandungan Sukrosa Daun Padi Hitam	40
4.3 Rata-Rata Kandungan Gula Reduksi Daun Padi Hitam	41
4.4 Rata-Rata Kandungan Klorofil Daun Padi Hitam	42
4.5 Rata-Rata Jumlah Malai Per Tanaman	44
4.6 Rata-Rata Berat Gabah Per Tanaman	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1.1	1
1.2	3
2.1	6
2.2	15
2.3	17
2.4	18
2.5	20
2.6	20
2.7	22
2.8	26
2.9	27
2.10	28
3.1	33
4.1	38
4.2	40
4.3	41
4.4	42
4.5	43
4.6	44
4.7	45
4.8	47
4.9	47

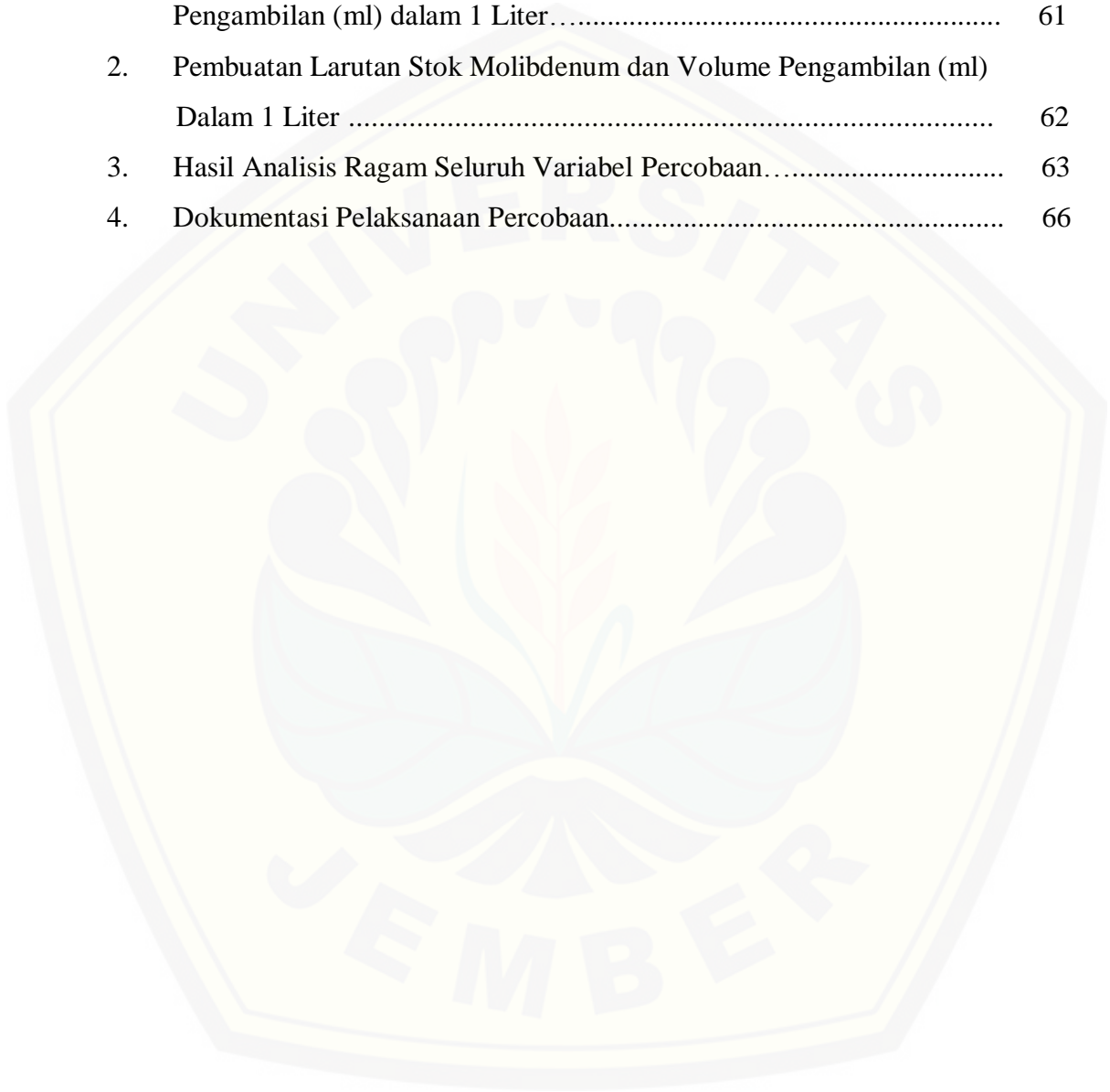
4.10 Pemanjangan Sel Sebagai Respon Terhadap Auksin : Hipotesis

Pertumbuhan Asam..... 49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi Larutan Nutrisi Hoagland dan Arnon (1950) dan Volume Pengambilan (ml) dalam 1 Liter.....	61
2. Pembuatan Larutan Stok Molibdenum dan Volume Pengambilan (ml) Dalam 1 Liter	62
3. Hasil Analisis Ragam Seluruh Variabel Percobaan.....	63
4. Dokumentasi Pelaksanaan Percobaan.....	66

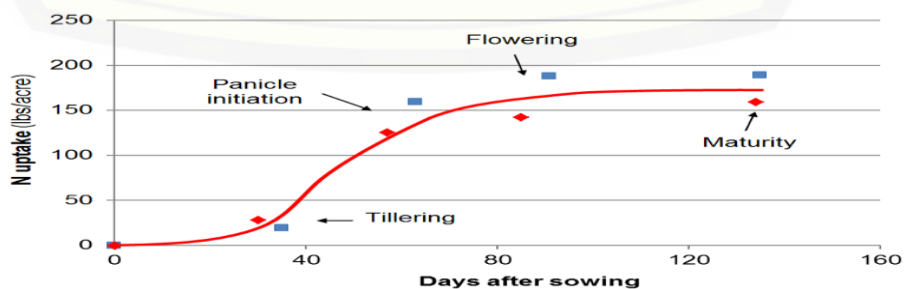


BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Padi hitam merupakan varietas lokal yang berpotensi untuk dikembangkan. Padi hitam mengandung pigmen antosianin (Wang *et al.*, 20017) dan flavonoid lima kali lebih tinggi daripada beras putih yang berperan sebagai antioksidan (Suhartini dan Suardi, 2010) sehingga sangat bermanfaat bagi kesehatan. Padi hitam/beras hitam masih jarang dibudidayakan dikarenakan banyak masyarakat yang belum mengetahui tentang padi hitam, umur padi hitam yang lebih panjang dibandingkan padi biasa (bisa mencapai 5-6 bulan), produktivitasnya yang rendah jika dibandingkan padi biasa (Kristantini *et al.*, 2009). Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas padi hitam adalah dengan pemupukan.

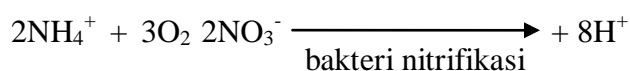
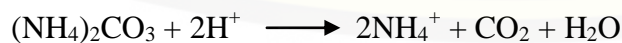
Pemupukan merupakan salah satu cara yang dilakukan untuk mensuplai kebutuhan unsur hara tanaman. Nitrogen merupakan unsur hara makro yang dibutuhkan oleh semua jenis tanaman termasuk tanaman padi hitam. Tanaman padi hitam membutuhkan N selama masa vegetatif untuk memicu pertumbuhan dan pembentukan anakan yang dapat menentukan potensi jumlah malai tanaman. Nitrogen berkontribusi dalam menentukan produksi gabah selama masa awal pembentukan malai dan akhir malai. Nitrogen juga berperan dalam pengisian biji, meningkatkan kapasitas fotosintesis, dan memicu akumulasi karbohidrat di batang dan pelepah daun (Tayefe *et al.*, 2014). Kebutuhan tanaman padi terhadap nitrogen menurut California Department of Food And Agriculture (2011) dapat dilihat pada Gambar 1.1



Gambar 1.1 Kebutuhan Nitrogen untuk Tanaman Padi

Pemberian nitrogen pada tanaman padi hitam harus diberikan secara tepat agar dapat menunjang pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara optimal. Urea sebagai sumber nitrogen yang umum diaplikasikan di lahan untuk tanaman padi harus diberikan dalam jumlah yang tepat. Pemberian urea yang kurang dari jumlah yang dibutuhkan oleh tanaman padi hitam mengakibatkan defisiensi sedangkan pemberian urea yang berlebihan menyebabkan toksisitas nitrogen. Tanaman padi yang ditanam di sawah seringkali terlihat menguning saat fase vegetatif. Hal ini dapat disebabkan karena tanaman padi mengalami defisiensi nitrogen atau unsur hara lain. Tanaman padi yang mengalami defisiensi nitrogen menurut deskripsi Better Crops International (2002) menunjukkan gejala daun-daun tua berwarna hijau muda, terjadi klorosis pada ujung daun, daun muda umumnya lebih hijau daripada daun tua dengan ukuran daun yang sempit, pendek, dan tegak. Sedangkan gejala toksisitas nitrogen menurut IRRI (2002) adalah daun tanaman padi berwarna sangat hijau dan daun tumbuh dengan sangat lebat dengan batang yang tipis sehingga mudah diserang hama dan penyakit.

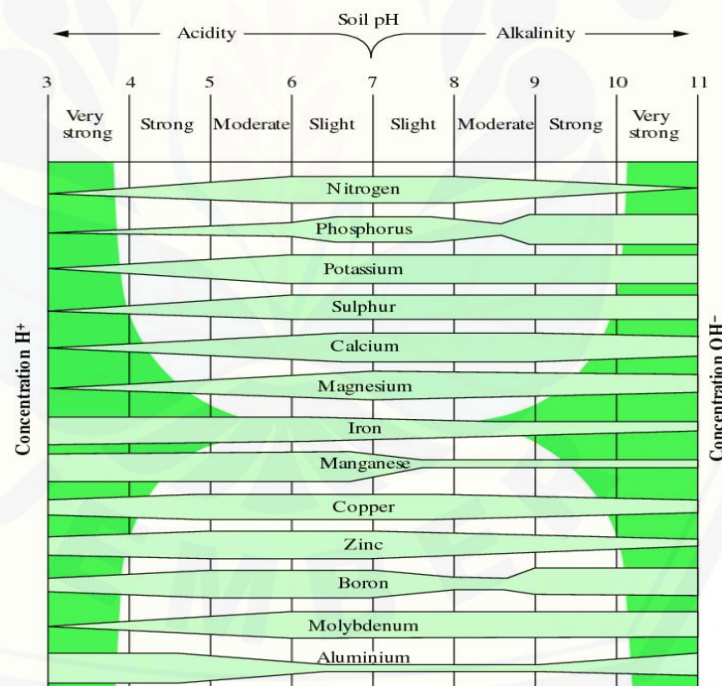
Defisiensi unsur hara lain yang dibutuhkan oleh tanaman padi justru dapat timbul akibat aplikasi urea yang berlebihan dan kontinu. Aplikasi urea yang berlebihan menyebabkan permasalahan lain bagi tanah. Aplikasi urea dapat menyebabkan perubahan pH tanah menjadi lebih masam. Hal ini dikarenakan amonium yang dihasilkan dari hidrolisis urea sebagian menjadi substrat untuk nitrifikasi oleh bakteri yang melepaskan ion H^+ lebih besar daripada sebelumnya (Potash and Phosphate Institute, 1995). Penggunaan pupuk urea pada lahan padi dapat mengakibatkan penurunan pH hingga 5,5 (Fageria *et al.*, 2010). Reaksi hidrolisis urea ketika diberikan di lahan adalah sebagai berikut :



Faktor lain yang dapat menyebabkan kemasaman akibat pemupukan urea adalah proses leaching ion nitrat yang disertai kation seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan K^+ untuk

menjaga muatan listrik tanah. Pergantian kation ini digantikan tempatnya oleh ion H^+ yang mengakibatkan tanah menjadi masam (Fageria *et al.*, 2010).

Pemasaman tanah yang disebabkan oleh aplikasi urea yang berlebihan menyebabkan akumulasi Al, Mn, dan Fe menjadi berlimpah sedangkan sebagian besar unsur hara tidak tersedia bagi tanaman termasuk unsur mikro molibdenum. Ion Al^{3+} akan terhidrolisis membentuk aluminium hidroksida dan mengikat molibdenum dengan sangat kuat, begitu juga dengan besi (Schulte, 2004) sehingga molibdenum menjadi tidak tersedia bagi tanaman padi. Ketersediaan unsur-unsur hara dan kaitannya dengan pH tanah menurut Australian Society of Plant Scientist, New Zealand Society of Plant Biologists dan New Zealand Institute of Agricultural and Horticultural Science (1999) digambarkan dalam diagram yang ditunjukkan oleh Gambar 1.2.



Gambar 1.2 Hubungan Ketersediaan Nutrisi Bagi Tanaman dan pH Tanah. Bar horisontal menunjukkan ketersediaan nutrisi terhadap pH tanah. Semakin besar bar menunjukkan semakin banyak nutrisi yang tersedia bagi tanaman.

Unsur mikro molibdenum dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang sedikit yaitu sekitar 0,01 ppm untuk tanaman padi. Kebutuhan tanaman akan molibdenum sangat kecil, akan tetapi kekurangan molibdenum dapat mengakibatkan gangguan pada pertumbuhan dan perkembangan tanaman padi. Gejala defisiensi molibdenum menurut Weir (2004) pada tanaman padi adalah tanaman tumbuh kerdil dan daun tidak dapat berkembang penuh dengan warna hijau pucat atau kekuningan di antara tulang daun dan sepanjang sisi daun. Pada tahap perkembangan lebih lanjut, jaringan tepi daun mengalami kematian (nekrosis).

Defisiensi molibdenum yang menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan tanaman padi disebabkan oleh peran molibdenum dalam proses asimilasi nitrogen dalam tanaman terhambat. Molibdenum merupakan kofaktor dari enzim nitrat reduktase yang merupakan enzim kunci yang mengasimilasi nitrogen di dalam tubuh tanaman. Nitrat reduktase merupakan enzim inducibel yang induksinya dipicu oleh adanya substrat yaitu nitrat. Nitrat yang diserap oleh tanaman padi akan direduksi di bagian situs aktif yang mengandung molibdenum (kofaktor) menjadi nitrit. Nitrit selanjutnya akan direduksi menjadi ammonium hingga akhirnya menghasilkan glutamate yang berperan sebagai prekursor pembentuk klorofil dan asam-asam amino (Nicholas *et al.*, 1953) yang digunakan untuk pertumbuhan.

Upaya untuk mengembalikan ketersediaan unsur molibdenum dapat dilakukan dengan menaikkan pH tanah. Salah satu cara yang sering digunakan adalah melalui pengapuran. Aplikasi kapur yang diberikan pada tanah masam membutuhkan sekitar 2-8 ton per hektar, tergantung tingkat kemasaman pH tanah dan tekstur tanah. Efek pengapuran terhadap ketersediaan molibdenum dan unsur hara lain berjalan sangat lambat. Pengapuran membutuhkan waktu hingga beberapa bulan agar unsur hara menjadi tersedia kembali bagi tanaman. Sehingga lebih menguntungkan apabila molibdenum diaplikasikan secara langsung pada lahan atau tanaman (Weir, 2004).

Aplikasi nitrogen dan molibdenum pada tanaman padi hitam diperkirakan akan mempengaruhi aktivitas enzim nitrat reduktase yang berperan dalam asimilasi nitrogen. Hasil dari proses tersebut menghasilkan glutamat sebagai

prekursor pembentuk klorofil, asam amino, dan protein sehingga sangat berpotensi menentukan pertumbuhan dan hasil tanaman padi hitam. Penelitian tentang pemupukan nitrogen dan molibdenum pada tanaman padi sudah banyak dilakukan, akan tetapi hanya sedikit penelitian yang menggunakan tanaman padi hitam sebagai tanaman model sehingga penelitian ini menarik untuk dikaji lebih lanjut.

1.2 Rumusan Masalah

Nitrogen dan molibdenum merupakan unsur yang berperan di dalam proses asimilasi nitrogen. Nitrogen dalam bentuk nitrat menjadi substrat dari enzim nitrat reduktase sedangkan molibdenum berperan sebagai kofaktor enzim nitrat reduktase yang membantu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Aktivitas enzim ini sering dikaitkan dengan pertumbuhan dan hasil pada tanaman padi sehingga perlu diketahui perbandingan taraf yang sesuai antara nitrogen dan molibdenum terhadap aktivitas enzim nitrat reduktase. Akan tetapi, taraf optimum nitrogen dan molibdenum terhadap aktivitas nitrat reduktase pada padi hitam belum diketahui sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

1.3 Tujuan

Percobaan ini bertujuan untuk :

1. Menentukan taraf optimum nitrogen dan molibdenum terhadap aktivitas enzim nitrat reduktase pada tanaman padi hitam.
2. Menentukan taraf terbaik nitrogen dan molibdenum terhadap beberapa variabel pertumbuhan dan hasil pada tanaman padi hitam.

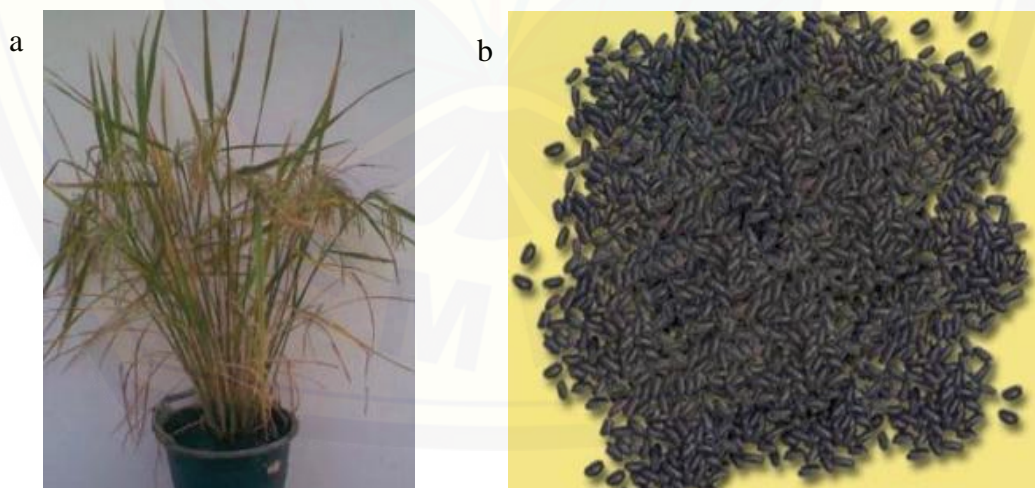
1.4 Manfaat

Aktivitas enzim asimilasi nitrogen dapat digunakan untuk mengetahui efisiensi penggunaan nitrogen pada padi hitam secara cepat tanpa menunggu hingga panen. Apabila aktivitas enzim tersebut dihubungkan dengan pertumbuhan tanaman maka dapat digunakan untuk memprediksi hasil tanaman.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Padi Hitam

Padi hitam/beras hitam merupakan varietas lokal yang mengandung pigmen paling baik, memiliki rasa dan aroma yang baik dengan penampilan yang spesifik dan unik. Warna beras diatur secara genetik, dan dapat berbeda akibat perbedaan gen yang mengatur warna aleuron, endosperma, dan komposisi pati pada endosperma (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2009). Beras hitam mempunyai kandungan serat pangan (*dietary fiber*) dan hemiselulosa masing-masing sebesar 7,5% dan 5,8%, sedangkan beras putih hanya sebesar 5,4% dan 2,2% (Narwidina, 2009 dalam Saadah *et al.*, 2013). Beras putih agak transparan hanya memiliki sedikit aleuron dan mengandung amilosa sekitar 20%. Pada beras merah, aleuron mengandung gen yang memproduksi antosianin sebagai sumber warna merah atau ungu. Pada beras hitam, aleuron dan endosperma memproduksi antosianin dengan intensitas tinggi sehingga warna beras menjadi ungu pekat mendekati hitam. Tampilan beras hitam dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Salah Satu Varietas Beras Hitam : (a) Galur Padi BoBM6 Hasil Persilangan BP140F/Silugonggo//*Oryza glaberrima*//Silugonggo, (b) Butir Padi BoBM6 Beras Hitam.

Cina membudidayakan beras hitam paling banyak, diikuti oleh Sri Lanka, Indonesia, India, Filipina, dan negara-negara lain (Pengkumsri *et al.*, 2015). Beras hitam memiliki khasiat yang lebih baik dibanding berasmerah atau beras warna lain. (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2009). Beras hitam khususnya kaya akan pigmen antosianin, fitokimia, protein, vitamin (Ichikawa *et al.*, 2011; Sompong *et al.*, 2011) serta senyawa radikal bebas (Pengkumsri *et al.*, 2015). Antosianin utama dalam beras hitam adalah cyanidin-3-glucoside (C3G) yang merupakan sumber antosianin penting di Asia. Selain itu, beras hitam mengandung fitokimia aktifseperti tokoferol, tokotrienol, oryzanols, vitamin B kompleks, dan senyawa fenolik (Jang *et al.*, 2012). Kandungan antosianin beras hitam jauh lebih tinggi dibandingkan beras putih dan beras merah (Maulida dan Arisoesilaningih, 2013; Suhartini dan Suardi, 2010; Wang *et al.*, 2007). Beras hitam juga kaya akan nutrisi seperti asam amino, kalium, magnesium, kalsium, zat besi, sumber serat, dan mineral. Beras hitam juga mengandung flavonoid lima kali lebih besar dibandingkan beras biasa (Suhartini dan Suardi, 2010).

Beras hitam lebih dikenal dengan kandungan antioksidannya yang sangat penting untuk peningkatan memori dan memperkuat sistem imun (Choi *et al.*, 2007). Beras hitam berkhasiat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit, memperbaiki kerusakan sel hati (hepatitis dan sirosis), mencegah gangguan fungsi ginjal, mencegah kanker/tumor, memperlambat penuaan, sebagai antioksidan, membersihkan kolesterol dalam darah, dan mencegah anemia. Beras hitam mengandung sedikit protein, namun kandungan besinya tinggi yaitu 15,52 ppm, jauh lebih tinggi dibanding beras dari varietas IR64, Ciherang, Cisadane, Sintanur, Pandanwangi, dan Batang Gadis yang kandungan besinya berkisar antara 2,9-4,4 ppm (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2009).

Salah satu varietas lokal padi hitam adalah padi hitam Bantul yang berasal dari daerah Njayan, Imogiri, Bantul. Berdasarkan penelitian Kristantini *et al.*, (2012), padi hitam Bantul mempunyai karakteristik sebagai berikut :

Tabel 2.1 Karakteristik dan Deskripsi Padi Hitam Bantul

No.	Karakter	Deskripsi Karakter
1	Panjang batang	Panjang (irigasi : > 130 cm, dataran rendah > 125 cm)
2	Kemampuan membentuk Anakan	Sangat rendah (<5)
3	Batang (jumlah)	Rendah (< 5 – 9)
4	Kematangan/umur tanaman	Panjang (121 – 140 hari)
5	Warna batang	Hijau muda
6	Warna kaki	Hijau tua
7	Warna helai daun	Hijau muda
8	Panjang daun	Pendek (21 – 40 cm)
9	Lebar daun (bendera)	Luas > 1,5 cm
10	Warna telinga daun	Putih (tidak berwarna)
11	Warna lidah daun (ligula)	Putih (tak berwarna)
12	Bentuk ligula	2-celah
13	Sudut daun	Turun
14	Sudut daun bendera	Turun
15	Kerontokan malai	Sedang (6 – 25%)
16	Jumlah gabah isi per malai	Sedang (150 – 200)
17	Sifat cabang malai	Semikompak malai
18	Cabang sekunder malai	Bergerombol (~3 – 4 cabang sekunder per cabang primer. Semua spikelet pada cabang sekunder memberi penampakan bergerombol).
19	Bentuk gabah	Ramping / panjang (panjang/lebar = > 3)
20	Warna gabah	Kuning dengan bercak ungu
21	Bentuk beras	Oval (p/l = 1, 1-20)
22	Panjang beras	Sedang (5, 51 – 6,6 mm)
23	Warna perikarp	Coklat hitam
24	Warna aleuron	Putih berbatas jelas

2.2 Pengaruh Nitrogen pada Tanaman Padi

Nitrogen (N) sering kali menjadi faktor pembatas utama terhadap pertumbuhan dan produksitanaman (Elser *et al.*, 2007). Nitrogen merupakan salah satu makronutrien bagi pertumbuhan tanaman padi dan merupakan salah satu

faktor utama yang dipertimbangkan untuk menghasilkan tanaman padi yang berproduksi tinggi (Wang *et al.*, 1993).

Tanaman menyerap unsur N dari tanah melalui akar dalam bentuk nitrat dan amonium (Sahrawy *et al.*, 2004). Sebagian amonium yang tersedia diserap oleh tanaman dan sebagian menjadi substrat dalam proses nitrifikasi. Adanya kemampuan padi dalam menghasilkan ROL (*Radial Oxygen Loss*) menyebabkan nitrifikasi di sekitar rhizosfer menjadi meningkat. Proses nitrifikasi meningkat menyebabkan akumulasi nitrat di sekitar rhizosfer yang kemudian diserap oleh tanaman padi (Li dan Wang, 2013). Serapan campuran kedua unsur nitrogen yaitu amonium dan nitrat pada tanaman padi memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan tanaman padi yang hanya menyerap nitrat atau amonium saja. Pemberian nitrat dengan rasio sepertiga N total yang diberikan (2,86 mM) mampu meningkatkan fotosintesis dibandingkan pemberian N tunggal sehingga membuat biomassa tanaman menjadi lebih tinggi (Zhang *et al.*, 2010).

Senyawa nitrogen inorganik (NH_4^+ , NO_2^- , dan NO_3^-) dapat mencapai kurang dari 5% daripada total nitrogen tanah. Senyawa-senyawa tersebut merupakan bentuk utama yang diserap oleh kebanyakan tanaman. 50% N digunakan oleh tanaman padi yang didapatkan dari kombinasi N organik tanah dan fiksasi biologi nitrogen oleh organisme bebas dan yang berasosiasi dengan tanaman padi (Ismunadji dan Dijkshoorn, 1971; Rahman *et al.*, 2009). Sisa N yang dibutuhkan oleh tanaman berasal dari aplikasi pupuk N yang diberikan (Rahman *et al.*, 2009). Hara N yang tersedia hanya diserap tanaman sekitar 30-45%, sisanya hilang dari sistem genangan air tanah melalui proses volatilisasi dan denitrifikasi (Ismunadji dan Dijkshoorn, 1971).

Tanaman padi membutuhkan N selama masa vegetatif untuk memicu pertumbuhan dan jumlah anakan yang akhirnya menentukan potensi jumlah malai padi (Ismunadji dan Dijkshoorn, 1971; Mae, 1997 dalam Tayefe *et al.*, 2014). Nitrogen berkontribusi terhadap produksi gabah selama masa pembentukan malai dan juga berpengaruh terhadap fase akhir malai. Nitrogen juga memerankan peran dalam pengisian biji, meningkatkan kapasitas fotosintesis, dan memicu

akumulasi karbohidrat di batang dan pelepah daun (Mae, 1997 dalam Tayefe *et al.*, 2014).

De Datta *et al.*, (1972) dalam Blumenthal *et al.*, (2008) menyatakan bahwa suplai nitrogen dan status nitrogen tanaman mempunyai efek yang jelas terhadap kandungan protein total pada padi. Protein dari bulir padi secara signifikan mengalami peningkatan dengan memastikan aplikasi pupuk nitrogen yang memadai hingga tahap inisiasi malai. Perez *et al.*, (1996) dalam Blumenthal *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa peningkatan efisiensi penggunaan pupuk nitrogen untuk mencapai hasil produksi tinggi dan kualitas bulir memerlukan perhatian lebih terhadap tingkat dan waktu aplikasi pupuk nitrogen sehingga total suplai nitrogen yang tersedia di tanah dan dari pupuk sesuai dengan yang dibutuhkan oleh tanaman. Dalam sistem produksi tinggi, untuk meningkatkan suplai nitrogen yang sesuai dan kebutuhan tanaman terkadang memerlukan beberapa aplikasi yang terpisah, termasuk pemupukan N akhir pada saat fase berbunga.

Protein bulir padi juga mempunyai dampak yang luas terhadap karakter kualitas yang lain. Ketransparanan sering berkorelasi positif dengan kandungan protein beras giling dimana putihnya beras giling dapat menurun karena meningkatnya protein bulir. Melalui manajemen pupuk nitrogen yang tepat memungkinkan untuk meningkatkan kandungan protein dan ketransparanan sambil menjaga keputihan dalam batas yang diterima. Meskipun kandungan protein bulir juga mempengaruhi karakter kualitas lain terkait dengan palatabilitas seperti kelengketan dan kekenyalan, akan tetapi kecenderungan terhadap karakter tersebut sangat luas di wilayah dan negara yang berbeda (Blumenthal *et al.*, 2008).

Defisiensi N sering terjadi khususnya pada tanaman yang mendapat suplai pupuk N rendah yang ditanam di tanah marginal. Dibawah kondisi defisiensi N, tanaman menjadi klorosis, daun menjadi kekuningan dan pertumbuhan terhambat. Gejala lain dapat diamati pada daun yang tua karena N bergerak khusus ke daun muda dan organ reproduktif. Dengan gejala defisiensi N parah tanaman tidak dapat tumbuh dan kering. Dengan gejala defisiensi N sedang, pertumbuhan tanaman terhambat dan hasil menjadi lebih rendah daripada dibawah suplai N minimum. Lebih jauh, senes dan maturasi dipercepat akibat defisiensi N.

Sebaliknya kelebihan N memicu pertumbuhan pucuk. Dalam kasus budidaya padi, kelebihan N harus dihindari karena hal ini dapat memperpanjang pucuk dan menyebabkan *lodging* sebelum panen. Kelebihan N memicu pertumbuhan pucuk yang berlebihan dengan hasil jumlah buah dan biji yang lebih sedikit. Di bawah kondisi kelebihan N, tanaman terkadang menjadi lunak dan lemah serta rentan terhadap fungi dan serangga (Ohyama, 2010).

Ohyama (2010) juga menyatakan bahwa nitrogen merupakan elemen penting bagi semua organisme yang menyusun protein, asam nukleat (DNA, RNA), komponen asam amino, membran lipid, ATP, NADH, NADPH, koenzim, pigmen fotosintesis, metabolit sekunder, digunakan dalam beberapa fitohormon seperti sitokinin dan indole-3acetic acid. Tanaman mempunyai bagian yang spesifik tersusun dari nitrogen seperti klorofil yang esensial untuk fotosintesis, menerima energi dan mengaktifkan elektron ke dalam jalur transport elektron di membrane kloroplas. Klorofil mempunyai sebuah struktur mirip cincin-porfirin yang mengandung atom Mg pada bagian tengahnya dan berkoordinasi dengan atom N di empat cincin pirol termodifikasi.

Ketersediaan unsur N tanah yang lebih banyak dapat menghasilkan protein yang lebih banyak, semakin tinggi pemberian nitrogen semakin cepat pula sintesis karbohidrat yang diubah menjadi protein dan protoplasma peningkatan protein dalam tubuh tanaman akan meningkatkan kadar N dalam jaringan tanaman. pada saat cahaya dan ketersediaan unsur nitrogen maksimal, penyerapan nitrogen menjadi optimal. Intensitas cahaya yang tinggi mengakibatkan proses transpirasi pada tanaman meningkat, sehingga aliran air yang membawa nitrat dari tanah menuju ke daun meningkat. Pada saat cahaya dan ketersediaan unsur nitrogen tidak maksimal maka tanaman akan menurunkan titik kompensasi cahaya dan menggunakan N organik yang tersedia untuk mempercepat laju fotosintesis. Hal ini mengakibatkan sintesis karbohidrat yang nantinya diubah menjadi protein dan protoplasma meningkat. Peningkatan kadar protein pada tanaman akan meningkatkan kadar N dalam jaringan tanaman (Latifa *et al.*, 2009).

2.3 Peran Molibdenum (Mo) pada Tanaman Padi

Mo merupakan unsur yang sangat *mobile* di dalam tanah. Jumlah Mo dalam tanah sangat sedikit yaitu berkisar antara 0,2 hingga 10 ppm dan umumnya antara 0,5 hingga 3,5 ppm (Hakim *et al.*, 1986). Jumlah ini relatif lebih banyak pada tanah liat daripada tanah pasir dan tanah organik. Roesmarkam dan Yuwono (2002) menyatakan bahwa harkat Mo dalam tanah adalah sangat tinggi bila lebih besar dari 1,50 ppm; tinggi 1,10 – 1,50 ppm; sedang 0,51 – 1,00 ppm, rendah 0,11 – 0,50 ppm dan sangat rendah bila lebih rendah dari 0,10 ppm.

Ketersediaan molibdenum tergantung pada pH tanah. Molibdenum pada tanah masam akan tidak tersedia bagi tanaman (Weir, 2004). Aluminium hidroksida dan besi akan mengikat molibdenum dengan sangat kuat sedangkan kalsium pada tanah kalkareus tidak (Schulte, 2004). Hal inilah yang menyebabkan mengapa defisiensi molibdenum terjadi pada tanah masam dibandingkan tanah netral atau tanah alkali. Sangat sedikit sekali kasus defisiensi molibdenum yang terjadi di atas pH 6.00, tetapi mayoritas defisiensi terjadi pada pH 5.5 atau di bawahnya. Pengapuran dapat mengembalikan ketersediaan molibdenum secara perlahan dan biasanya membutuhkan waktu hingga beberapa bulan agar tanah menjadi tidak defisiensi. Jumlah kapur yang dibutuhkan berkisar 2 – 8 ton per hektar, tergantung ph awal dan tesktur tanahnya. Meskipun pengapuran sepertinya menjadi langkah yang menguntungkan, namun akan lebih cepat dan murah apabila mengaplikasikan molibdenum secara langsung pada tanah atau tanaman (Weir, 2004).

Tanaman padi mengambil molibdenum dalam bentuk molibdate dari tanah hanya dalam jumlah kecil berkisar 0,01 ppm untuk memenuhi kebutuhannya. Kebanyakan tanah dapat menyediakan molibdenum dalam jumlah cukup, kecuali pada tanah masam. Defisiensi juga dapat terjadi di tanah gambut dan tanah dengan curah hujan tinggi yang ketersediaan nutrisinya sangat rendah (International Molybdenum Association, 2013). Ketika molibdenum diaplikasikan pada lahan, biasanya memerlukan sekitar 75 g – 1 kg/ha, tergantung tanaman dan sumber molibdenum yang digunakan (Weir, 2014).

Transisi metal molibdenum dalam bentuk molibdate esensial bagi tanaman dan diperlukan oleh sejumlah enzim yang mengkatalisasi reaksi kunci dalam proses asimilasi nitrogen, degradasi purin, sintesis fitohormon, dan detoksifikasi sulfid. Secara biologi molibdate inaktif dan perlu untuk dikomplekskan oleh organik spesifik pterin untuk membentuk ikatan permanen grup prostetik, kofaktor molibdenum, untuk molibdo-enzim (Bittner, 2014). Mo terikat dengan protein senyawa bernama molibdenum kofaktor yang unik yang mengikat beragam apoprotein. Mo-enzim ini berpartisipasi dalam reaksi redoks yang penting dalam siklus C, N, dan S secara global (Mendel dan Hansch, 2002).

Molibdate merupakan sebuah senyawa yang sangat *mobile*. Penyerapan molibdate akan terganggu dengan adanya inhibitor seperti sulfat di dalam tanah (Bittner, 2014). Mo ada di tanah dalam bentuk oksidasi yang bervariasi, mulai dari II hingga VI, tetapi hanya Mo terlarut (VI) yang tersedia bagi tanaman. Dengan menurunnya pH, Mo dapat diserap oleh koloid tanah. Mo juga lebih banyak tersedia untuk tanaman pada nilai pH yang lebih tinggi. Kebutuhan tanaman akan Mo sangat rendah, tetapi defisiensi Mo telah dilaporkan terjadi pada banyak spesies tanaman termasuk herba, tanaman pertanian, dan pada pohon, hal ini terutama disebabkan kurangnya NR untuk mengkatalis proses awal pada asimilasi nitrat. Gejala yang tampak dari defisiensi Mo bervariasi tergantung spesies tanaman dan mayoritas menunjukkan klorosis atau penguningan pada daun (Mendel dan Hansch, 2002).

Mendel dan Hansch (2002) menyatakan bahwa elemen molibdenum esensial hampir pada semua organisme dan terdapat pada lebih dari 40 enzim katalisator berbagai reaksi redoks. Empat jenis ditemukan pada tanaman yaitu (1) Nitrate reduktase katalisator yang merupakan kunci awal pada asimilasi nitrogen anorganik; (2) aldehyde oxidase yang berperan sebagai katalisator dalam proses akhir biosintesis fitohormon asam absisat (3) xanthine dehydrogenase yang terlibat dalam katabolisme purin dan reaksi stress, dan (4) sulphite oxidase yang kemungkinan terlibat dalam detoksifikasi eksek sulfid. Hewitt (1975) menambahkan bahwa Mo merupakan salah satu unsur hara yang dibutuhkan oleh tanaman terutama untuk ANR (Aktivitas Nitrat Reduktase). Bala dan Hossain

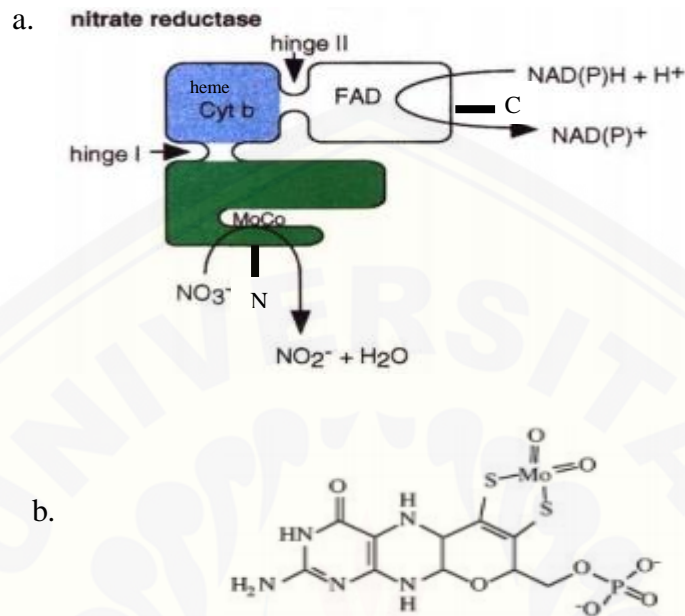
(2008) mengatakan bahwa kandungan nitrogen dan penyerapan di bulir dan jerami menunjukkan hasil yang lebih baik ketika diaplikasikan Mo 100 ppm atau 200 ppm yang ditambah dengan NPK atau bahan organik seperti kotoran sapi atau kompos. Penambahan Mo juga mempengaruhi persentase protein dari bulir.

Tingkat intraseluler molibdate secara ketat dikontrol oleh transporter molibdenum, secara tertentu selama perkembangan tanaman. Selain itu diduga terdapat hubungan erat antara molibdenum dan metabolisme besi karena : (1) mekanisme pengambilan molibdate dan besi saling mempengaruhi satu sama lain, (2) kebanyakan molibdo-enzim juga membutuhkan grup redoks yang mengandung besi seperti gugus besi sulfur atau heme, (3) metabolisme molibdenum telah merekrut mekanisme tipikal untuk sintesis besi sulfur, dan (4) sintesis kofaktor molibdenum dan protein besi sulfur ekstrasitokondria melibatkan fungsi spesifik transporter mitokondria *ABC-type* (Bittner, 2014).

Transporter Mo pada tanaman belum diketahui hingga saat ini, sehingga molibdate diduga ditransport secara tidak spesifik oleh transporter anion lain. Defisiensi fosfor mampu meningkatkan penyerapan radiolabel molibdate yang afinitasnya rendah hingga 5x, sehingga diduga penyerapan molibdate dapat terjadi melalui sistem penyerapan fosfat. Selain itu transporter sulfat juga diduga berperan dalam penyerapan molibdate ke dalam sel karena penyerapan molibdate dapat dihambat oleh jumlah sulfat yang terlalu banyak (Mendel dan Hansch, 2002). Llamas *et al.*, (2000) menyatakan bahwa penyerapan molibdate terdiri dari dua sistem yaitu sebuah sistem yang mempunyai afinitas besar tetapi kapasitas transporter-nya rendah yang tidak sensitif terhadap tungstate dan dapat dihambat oleh sulfat, dan sebuah sistem transporter besar (afinitas rendah, kapasitas tinggi) yang dapat dihambat oleh tungstate tapi bukan sulfat.

Molibdenum merupakan komponen umum nitrat reduktase dan kofaktor molibdenum (Mo-co) merupakan pusat aktivitas enzim (Morozkina dan Zvyagilskaya, 2007). Nitrat reduktase eukariotik hanya aktif sebagai homodimer dan dimerisasinya tergantung pada kehadiran MoCo (Campbell, 2001). Semua enzim molibdenum eukariotik mempunyai atom molibdenum yang terikat oleh

dua atom sulfur (ene-dithiolate) derivatif pyranopterin yang disebut dengan molybdopterin (Fischer *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 a. Susunan Domain NR; b. Struktur MoCo

Gambar 2.2 a menunjukkan monomer dari NR pada tanaman terdiri dari 3 domain fungsional : domain terminal-N yang berasosiasi dengan Moco, domain heme tengah (sitokrom b), dan domain-FAD C-terminal. Tiap grup prostetik aktif-redoks terikat dengan monomer dalam rasio 1:1:1. Domain ini dihubungkan oleh bagian engsel sensitif-protease. Pada keadaan aktif, semua enzim homodimer (Gambar 2.2 menunjukkan monomer saja) (Mendel dan Hansch, 2002). MoCo domain diawali sebuah perpanjangan N-terminal yang kaya residu asam yang bervariasi antara 7 dan 121 residu dengan panjang 60 (fungi) hingga 99 residu (tanaman) tanpa konservasi signifikan (Fischer *et al.*, 2005). MoCo hanya dapat menyatu sebelum atau selama penyelesaian pelipatan dan dimerisasi dari monomer apoprotein (Enroth *et al.*, 2000). Enroth *et al.*, (2000) menyatakan hanya struktur kristal untuk heme dan domain FAD dari NR yang telah diketahui ujungnya. Sampai sekarang belum diketahui bagaimana dan kapan FAD dan heme terikat ke protein. Tiga domain dari pusat redoks mengkatalis transfer elektron

dari reduksi NAD(P)H melalui FAD, heme, MoCo ke nitrat (Mendel dan Hansch, 2002).

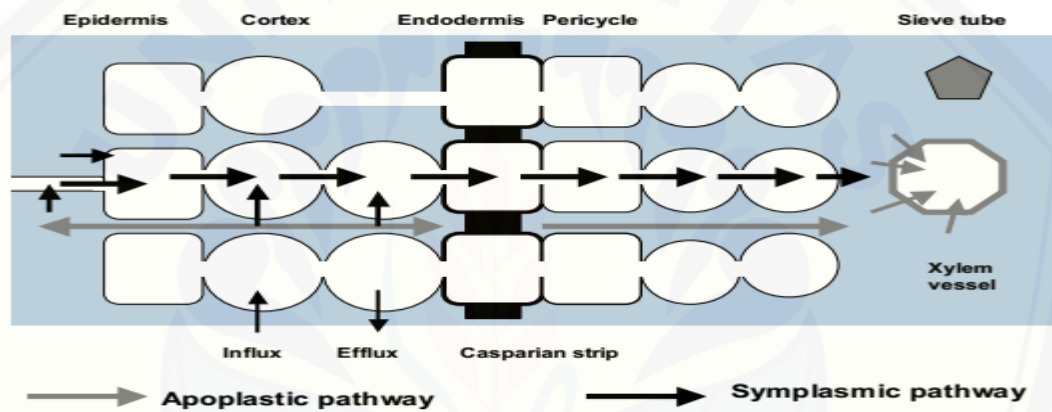
2.4 Asimilasi Nitrogen

Tanaman menyerap nitrogen terutama di akar dari tanah meskipun N dapat diserap dari daun ketika urea atau pupuk lain diaplikasikan dengan cara disemprotkan ke daun. Tanaman tidak dapat menyerap secara langsung sumber utama nitrogen yang berasal dari bahan organik. Senyawa inorganik dilepaskan melalui proses mineralisasi dari bahan organik, dekomposisi sampah organik, atau dari pupuk kimia. Bentuk senyawa N inorganik paling banyak di tanah adalah ammonium (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-), meskipun organik, senyawa N seperti asam amino dapat diserap (Ohyama, 2010).

Ohyama (2010) menyatakan di bawah kondisi tanah yang reduktif seperti pada tanaman padi, ammonium merupakan bentuk yang paling dominan dari N inorganik. Yoneyama (1991) menyatakan bahwa amonium lebih banyak diserap pada ujung akar, sedangkan nitrat pada sepanjang akar rambut. Hal ini dikarenakan ammonium relatif lebih mantap dalam kondisi tergenang (reduksi) sehingga dalam lingkungan oksidasi akan mengalami nitrifikasi menjadi nitrat yang mudah hilang melalui sistem pengairan. Ohyama (2010) menyatakan ammonium juga merupakan bentuk N di *late-succession temperate* dan *boreal forest environments*. Sebaliknya nitrat adalah bentuk N inorganik utama di tanah pertanian dan ekosistem alami yang beraerasi baik, termasuk tanah dataran tinggi dan padang rumput. Bentuk dominan dimana N lebih banyak diserap oleh tanaman tergantung pada kondisi tanah dan spesies tanaman. Pada larutan kultur, penyerapan ammonium menurunkan pH, sedangkan absorpsi nitrat meningkatkan pH. Oleh karena itu, campuran ammonium dan nitrat mungkin menstabilkan larutan pH (Ohyama, 2010).

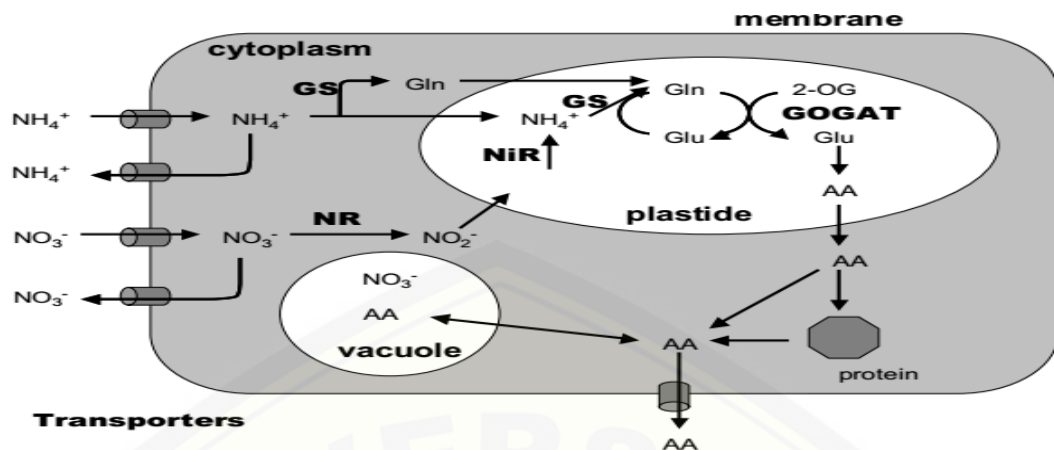
Gambar 2.3 menunjukkan aliran nutrien dari tanah ke pembuluh xylem akar yang terletak di sebuah stele (silinder tengah) melalui jalur apoplast dan simplast. Nutrien seperti NH_4^+ dan NO_3^- di larutan tanah diserap oleh sel kulit luar melalui rambut akar, kemudian ditransportasikan dari sel ke sel melalui

plasmodesma dalam jalur simpas. Sebaliknya, nutrien yang masuk dalam ruang kosong di akar ditransportasikan melalui jalur apoplas yang diserap oleh sel korteks. Jalur apoplas di endodermis ditutup oleh *Casparian-strip* yang kedap air dimana nutrien dan air tidak dapat masuk ke stele dalam jalur ini. Oleh karena itu, nutrien harus diserap baik dalam epidermis atau di kortekssel dan ditransport melewati endodermis melalui plasmodesmata oleh jalur simpas. Kemudian nutrisi dilepaskan dari sel parenkim stele ke apoplast stele, dimuat ke dalam pembuluh xylem dan ditransportasikan ke pucuk. Penggerak dari transport xylem ini adalah transpirasi dari daun dan tekanan akar (Ohyama, 2010).



Gambar 2.3 Penyerapan Nutrien pada Akar Tanaman

Ammonium adalah komponen kunci dalam asimilasi nitrogen menjadi senyawa organik, dimana N berasal dari nitrogen inorganik dari tanah atau dari fiksasi nitrogen. Nitrat yang diserap dari akar direduksi di akar menjadi nitrit dan kemudian ammonium, atau nitrat ditransportasikan ke pucuk dan direduksi di daun menjadi ammonium. Produk utama lain dari fiksasi nitrogen oleh enzim nitrogenase adalah ammonia. Ammonium juga disediakan melalui fotorespirasi di mitokondria melalui deaminasi gylsin, melalui jalur phenylpropanoid di plastid, dan melalui degradasi protein dan deaminasi asam amino (Ohyama, 2010).



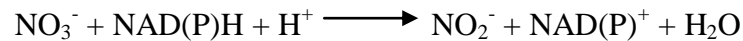
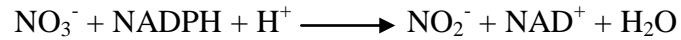
Gambar 2.4 Proses Penyerapan dan Asimilasi Nitrogen di Sel Tanaman

Gambar 2.4 menunjukkan bahwa ion ammonium digabungkan oleh ammonium transporter yang terletak di membran sel. Ammonium diserap dari luar sel pertama kali diasimilasi oleh glutamate (Glu) untuk menghasilkan glutamine (Gln) oleh enzim glutamine synthetase (GS). Glutamine selanjutnya akan segera diubah menjadi glutamat oleh enzim glutamat synthase (GOGAT).

2.5 Nitrat reduktase (NR) dan Nitrit Reduktase (NiR)

NR merupakan enzim penting dalam proses asimilasi nitrogen yang mengkatalis reduksi nitrat menjadi nitrit (Sahrawy *et al.*, 2004). Hemalatha (2002) dan Ohyama (2010) menyatakan nitrat (NO_3^-) direduksi menjadi nitrit (NO_2^-) di akar atau daun tanaman oleh enzim nitrat reduktase (NR) yang terletak di sitosol sebagai tingkatan langkah yang membatasi dan mengatur masuknya nitrogen inorganik (NO_3^-) menjadi bentuk organik pada tanaman. Tischner (2000) menyatakan proses reduksi memerlukan NADH/NADPH atau keduanya sebagai donor elektron. Ketika konsentrasi nitrat tinggi di jaringan, nitrat sementara akan disimpan di vakuola sel kortek akar tanaman (Ohyama, 2010). Aktivitas dari enzim ini memberikan prediksi yang bagus terhadap status nitrogen pada tanaman dan sangat sering berkorelasi dengan pertumbuhan dan hasil tanaman (Galib, 2015).

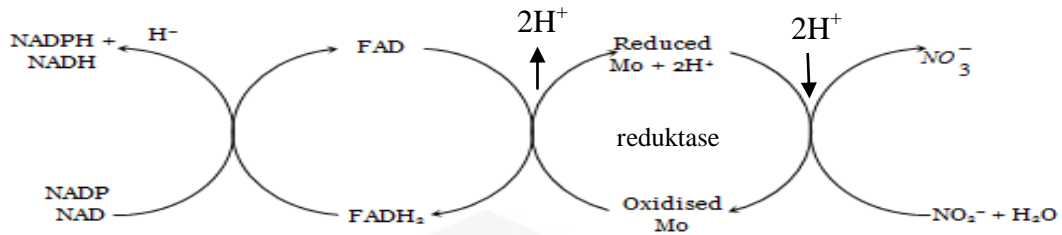
Menurut Ohyama (2010), pada tanaman tingkat tinggi, ada dua tipe NR yaitu :



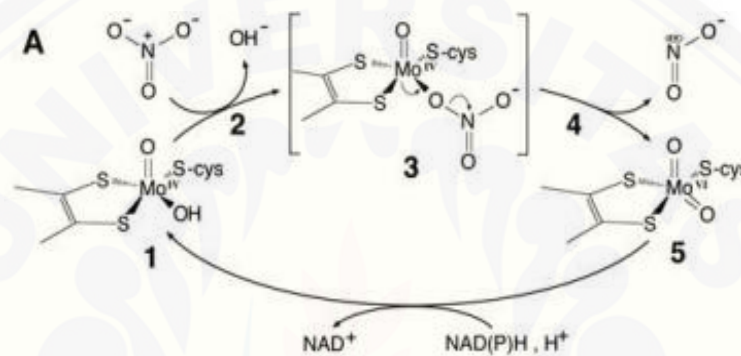
Reduksi nitrat terjadi di akar dan pucuk tanaman tetapi terpisah antara sitoplasma dimana reduksi terjadi dan plastida/kloroplas dimana reduksi nitrit terjadi. Reduksi nitrat menjadi nitrit dikatalisasi di sitosol oleh enzim nitrat reduktase (NR). Enzim ini merupakan sebuah homodimer, dimana tiap monomer berasosiasi dengan tiga kelompok prostetik: flavin adenin dinukleotida (FAD), heme, dan sebuah kofaktor molibdenum (MoCo). Meskipun enzim NR terletak di sitosol, terdapat asosiasi dengan membran plasma seperti yang telah ditemukan pada akar jagung dan barley (Daubresse *et al.*, 2009).

NR mentransfer dua elektron dari NAD(P)H ke nitrat melalui tiga pusat redoks yang tersusun dari dua grup prostetik (flavin adenin dinukleotida [FAD] dan heme) dan sebuah kofaktor MoCo yang merupakan kompleks molibdate dan pterin. Tiap pusat redoks berasosiasi dengan sebuah domain fungsional enzim yang mempunyai aktivitas bebas terhadap domain lain. Sebagai contoh, hanya dua domain NR yaitu domain heme dan FAD yang diperlukan untuk mengkatalisasi reaksi di sitokrom c yang digunakan sebagai pengganti nitrat sebagai penerima elektron alternatif (Crawford, 1995).

Mendel dan Hansch (2002) menyatakan nitrat reduktase merupakan enzim yang digolongkan sebagai molibdoflavoprotein karena mengandung molibdenum dan koenzim Flavin Adenin Dinukleotida (FAD) yang berfungsi sebagai pembawa elektron. FAD dan Mo berfungsi karier elektron dari NADH_2 ke NO_3^- tereduksi. NADPH/NADH berfungsi sebagai donor elektron. NADH/NADPH dapat berasal dari siklus krebs atau fotosintesis. Jalur transfer elektron dari NADPH atau NADH melalui FAD dan Mo serta proses asimilasinya dapat dilihat dalam Gambar 2.5 sedangkan siklus reaksi reduksi nitrat oleh NR yang melibatkan Mo dapat dilihat dalam Gambar 2.6.



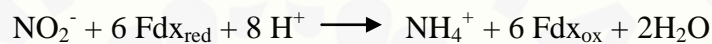
Gambar 2.5 Jalur Transfer Elektron Dari NADH atau NADPH Melalui FAD dan Molibdenum Serta Proses Asimilasinya



Gambar 2.6 Siklus Reaksi Reduksi Nitrat oleh NR yang Melibatkan Mo. Reaksi dimulai dengan reduksi pusat Mo(IV) (1). Nitrat mengikat situs aktif (2) dan menggantikan ligan ekuatorial hidroksido/air, membentuk reaksi intermediate (3). Di atas oksidasi pusat Mo menjadi Mo(VI), ikatan antara oksigen nitrat dan nitrogen terlepas dan nitrit akan dilepaskan (4 dan 5). Setelah menyelesaikan setengah reaksi reduksi, Mo teregenerasi [(Mo(IV))] untuk siklus selanjutnya.

Siklus katalitis NR dapat dibagi menjadi 3 bagian : setengah reaksi reduktif dimana NAD(P)H mereduksi FAD, transfer elektron melalui domain intermediate sitokrom b₅, dan setengah reaksi oksidatif dimana pusat Mo mentransfer elektronnya ke nitrat sehingga membentuk nitrit dan hidroksida (Fischer *et al.*, 2005). Reduksi nitrat berlangsung setelah NADH atau NADPH teroksidasi, kemudian elektron yang dihasilkan oleh FAD dirangkaikan pada reduktase yang mengandung Mo. Elektron dan proton akan dilepas dari NADPH ke FAD dan menghasilkan FAD tereduksi (FADH₂). Elektron dan proton kemudian terlepas kembali dari FADH₂ ke Mo teroksidasi dan menghasilkan Mo tereduksi, yang melepaskan elektron dan proton ke nitrat dan mereduksi nitrat

tersebut menjadi nitrit (Heldt, 2005). Setelah reduksi nitrat, nitrit ditranslokasikan ke kloroplas untuk direduksi menjadi amonium oleh enzim kedua dalam siklus yaitu nitrit reduktase (NiR) yang dikode oleh gen *Nii* (Daubresse *et al.*, 2009). Nitrit reduktase diaktivasi oleh ion nitrat dan nitrit dengan umpan maju yang positif, sedangkan metabolisme nitrat mengatur enzim ini dengan strategi penghambatan umpan balik. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa nitrit reduktase mempunyai koregulasi dengan nitrat reduktase yang kemungkinan mempunyai mekanisme yang hampir sama (Faure *et al.*, 1991). Amonium selanjutnya akan diasimilasi oleh GS menjadi glutamine (Ohyama, 2010). Reduksi nitrit dapat ditulis dalam reaksi berikut :

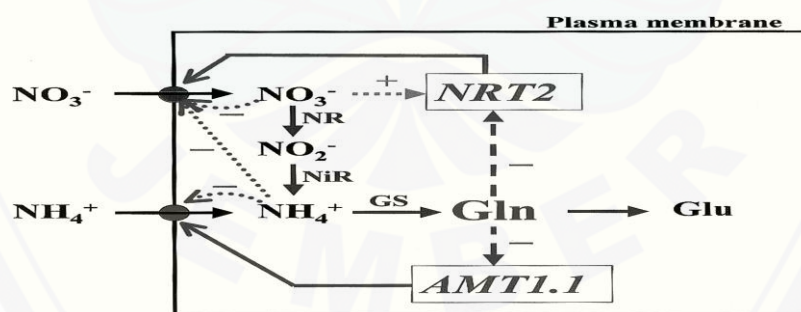


Koregulasi yang terjadi antara nitrit reduktase dan nitrat reduktase diperlukan untuk mencegah akumulasi nitrit yang merusak. Konsentrasi nitrit tinggi ditransformasikan menjadi asam nitrogen yang sangat mutagenik dan nitrosamin yang juga menghancurkan jaringan. Selanjutnya nitrit juga dapat mencegah transfer elektron antara dua fotosistem dalam transport elektron fotosintesis. Regulasi metabolisme yang terjadi pada nitrat reduktase dan nitrit reduktase akan mencegah akumulasi metabolik toksik lanjutan dan menyimpan energi untuk pertumbuhan tanaman (Malolepsza, 2007; Meyer *et al.*, 2005).

Suplai nitrat pada konsentrasi tinggi dapat mengurangi produksi asam amino. Suplai nitrat tinggi meningkatkan ammonium endogen yang mengakibatkan meningkatnya produksi glutamin. Glutamin sebaliknya menghambat produksi asam amino dan penyerapan nitrat selanjutnya (Suzuki dan Knaff, 2005; Vanoni *et al.*, 2005). Suplai nitrat tinggi menunjukkan gejala toksisitas pada tanaman yang mengakibatkan penurunan produksi biomassa tanaman, khususnya protein. Akumulasi nitrat yang tinggi menghasilkan produksi nitrit yang diubah menjadi oksida nitrit. Oksida nitrit dan ion superoksida dapat secara cepat dikombinasikan oleh nitrat reduktase untuk membentuk peroksinitrit yang sangat toksik bagi tanaman. Peroksinitrit memodifikasi residu tirosin dari protein (nitrosasi) yang menginaktivasi beberapa protein dan enzim sehingga mengakibatkan pengurangan produksi biomassa. Selain itu, akumulasi nitrat di

tanaman yang dihasilkan dari suplai nitrat yang berlebihan sangat berbahaya bagi manusia dan tanaman (Malolepsza, 2007; Meyer *et al.*, 2005).

Tingkatan regulasi molekular enzim NR dikontrol oleh gen penghasil NR. Gen NR dapat diinduksi oleh nitrat, cahaya, dan glukosa. Sementara inhibitor gen NR berupa ammonia dan glutamin. Setelah gen NR mensintesis enzim NR, maka enzim NR akan diaktivasi oleh serangkaian protein kinase melalui jalur nitrat reduktase kinase. Protein kinase tersebut akan difosforilasi agar enzim NR menjadi aktif. Selain itu, ion Ca_2^+ juga dapat menstimulasi proses aktivasi enzim NR. Enzim NR juga memiliki inhibitor seperti protein inhibitor, asam oksalat, triosa fosfat, dan jenis fosfat ester yang lain yang mampu menonaktifkan enzim NR (Gambar 2.3) (Campbell, 1999). Jackson *et al.*, (2008) menyatakan bahwa selain gen NR yang terlibat dalam sintesis enzim NR dalam reduksi nitrat, ada gen yang lain yang bertindak sebagai transporter substrat enzim NR yakni gen NRT2 (NR Transporter). Gen NRT2 akan mensintesis protein transporter agar substrat berupa nitrat dapat masuk ke dalam sel. Gen NRT2 ini dapat dihambat oleh glutamin yang merupakan hasil perubahan dari ammonia. Ammonia juga dapat menghambat transportasi nitrat ke dalam sitosol yang dapat dilihat dalam Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Mekanisme Transportasi Nitrat ke Dalam Sitosol yang Dikendalikan Oleh Gen NRT2.

NR merupakan enzim inducibel yang diinduksi oleh substratnya yakni nitrat (Munzarova *et al.*, 2006) dan juga dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang lain seperti kadar CO_2 (Kaplan *et al.*, 1974), intensitas cahaya (Li & Oaks, 1994), pH (Shankar *et al.*, 2000), pupuk (Genenger *et al.*, 2003), salinitas dan kadar

gkukosa (Barabaset *al.*, 2000) serta pengenangan, varietas, dan umur tanaman (Galib, 2015). Kadar NR juga berkorelasi dengan kadar nitrat dalam organ tanaman. Hal ini dikarenakan enzim ini banyak tersebar di berbagai macam organ tanaman seperti daun, bunga, akar, batang, dan buah, namun penyebaran NR antara organ satu dengan yang lainnya berbeda di setiap tanamannya. Kadar NR paling banyak ditemukan di daun kemudian batang, akar, buah, dan yang terkecil ditemukan di biji (Santamaria *et al.*, 1999). Balotf dan Kavooosi (2011) menambahkan bahwa nitrat mempunyai efek positif terhadap aktivitas nitrat reduktase hanya pada suplai nitrat rendah, sedangkan pada suplai nitrogen tinggi aktivitas nitrat reduktase mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas nitrat reduktase dan akumulasi nitrit tergantung pada eksogenous nitrat.

Nitrat reduktase adalah enzim pengatur asimilasi nitrogen pada tanaman, yang diatur oleh perubahan terang/gelap. Meskipun respon aktivitas nitrat reduktase terhadap terang/gelap dapat bervariasi pada setiap spesies, pada umumnya aktivitasnya lebih tinggi pada kondisi terang daripada gelap. Cahaya meningkatkan aktivitas nitrat reduktase dengan cara mempercepat pengambilan nitrat. Aktivitas nitrat reduktase dipengaruhi oleh cahaya dengan cara meningkatkan laju fotosintesis yang akan menghasilkan karbohidrat dan NADH yang diperlukan untuk reduksi nitrat, dihasilkan dari karbohidrat tersebut bila terespirasi. Peningkatan laju fotosintesis ini diikuti dengan peningkatan respirasi, yang akan menghasilkan energi untuk mereduksi NO_3^- menjadi NO_2^- . Fotosintesis berhubungan erat dengan asimilasi nitrat yaitu pembentukan ion nitrat (NO_3^-) menjadi nitrit (NO_2^-) dan ion amonia (NH_3^+) menjadi asam amino. Aktivitas nitrat reduktase mempengaruhi sintesis asam amino (Campbell, 1999).

Hemalatha (2002) menunjukkan bahwa tingkat nitrat reduktase di jaringan tanaman dipengaruhi oleh aplikasi fitohormon eksogen. Pada umumnya, auksin mempunyai efek kecil pada nitrat reduktase, tetapi aktivitas yang jauh lebih rendah dapat dipulihkan dengan perlakuan asam absisat pada jaringan tanaman. Kebutuhan cahaya tanaman dapat dipenuhi dengan menyediakan konsentrasi sitokinin yang tepat dalam kondisi gelap. Induksi oleh sitokinin biasanya mengakibatkan kehadiran nitrat pada tingkat lebih tinggi. Kinetin

meningkatkan aktivitas nitrat reduktase dengan meningkatkan sintesis dan aktivasi enzim. Basa nitrogen adenin atau adenosin tidak mempunyai efek terhadap aktivitas nitrat reduktase. Hufon *et al.*, (1996) menyatakan bahwa pada tanaman tingkat tinggi, khususnya di daun, nitrat reduktase diregulasi oleh hormon dan suplai nitrogen. Enzim-enzim yang ada di sitosol diregulasi oleh hormon.

Hemalatha (2002) juga menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh mampu menstimulasi aktivitas nitrat reduktase bahkan dalam kondisi gelap. Nitrat mampu disuplai ke jaringan tanaman ketika pengatur tumbuh hadir di tanaman. Bagaimanapun, aktivitas enzim terstimulasi oleh pengatur tumbuh dengan kehadiran inhibitor sintesis protein 80S dan inhibitor sintesis RNA actinomycin D. Hal ini membuktikan bahwa lokasi enzim tersebut berada di sitosol dan regulasi aktivasi enzim terjadi pada level transkripsi dan translasi. Efek hambatan dari glutamin juga telah diamati saat kehadiran pengatur tumbuh. Efek stimulasi glisin dan sistein mungkin disebabkan oleh suplai energi yang berkurang dan stabilisasi enzim yang ketat. Secara umum, Galib (2015) menyatakan bahwa aktivitas enzim nitrat reduktase dalam jaringan tanaman merupakan sebuah keseimbangan antara laju relatif dari sintesis/degradasi dan aktivasi/inaktivasi.

NiR merupakan holoenzim dengan monomer (60-70kD) yang mempunyai 2 pusat redoks : *siroheme-Fe center* dan *iron-sulfur center* (Crawford, 1995) seperti pada alga, cyanobakteria dan tanaman (Luque *et al.*, 2015). Berdasarkan untaianya, setengah C-terminal NiR mengandung pusat redoks dan setengah N-terminal mengikat agen pereduksi feredoksin. Feredoksin direduksi oleh sistem transport elektron nonsiklik kloroplas yang menyediakan elektron untuk mereduksi nitrit. NiR juga aktif di akar dan ditemukan juga di proplastida. *Ferredoxin-like protein* direduksi oleh NADPH dari jalur fosfat pentosa oksidatif yang menjadi sumber reduktan. Sama halnya dengan nitrat reduktase, aktivitas NiR juga dipengaruhi oleh cahaya. Pada tanaman yang tumbuh secara etiolasi, jalur mediasi fitokrom meningkatkan tingkat mRNA, NR, dan NiR selama ditransfer ke terang (Crawford, 1995). Pada malam hari, reduksi nitrit dapat terjadi dari NADPH, dihasilkan dari siklus fosfat pentosa, oleh mediasi Fd-NADP⁺ oxidoreductase.

NiR juga mungkin merupakan sebuah pengontrol penting dalam asimiliasi nitrat (Davenport *et al.*, 2015) yang lebih jauh dibandingkan nitrat reduktase dan glutamine synthetase (Takahashi *et al.*, 2001). Pada tanaman transgenik tembakau yang ditumbuhkan dalam 20mM nitrat, over ekspresi gen *nii* menyebabkan aktivitas NiR mengalami peningkatan sebesar 30% dan meningkatkan aktivitas NR sebesar 2x lipat. Peningkatan ekspresi dan aktivitas NiR pada tanaman transgenik tembakau mampu menunda kerusakan protein dan klorofil selama masa senesen. Kloroplas akan memperpanjang aktivitas fotosintesis melalui produksi ATP dan mengurangi feredoksin yang dibutuhkan tidak hanya untuk asimilasi CO₂ tetapi juga untuk reduksi nitrit oleh NiR dan jalur GS/GOGAT (Davenport *et al.*, 2015). Hal ini sejalan dengan penelitian Kyaing *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa overekspresi NiR pada tembakau mendukung daun menjadi hijau dan terlihat mengalami senesen lebih lambat selama periode yang lebih lama dibandingkan dengan kontrol.

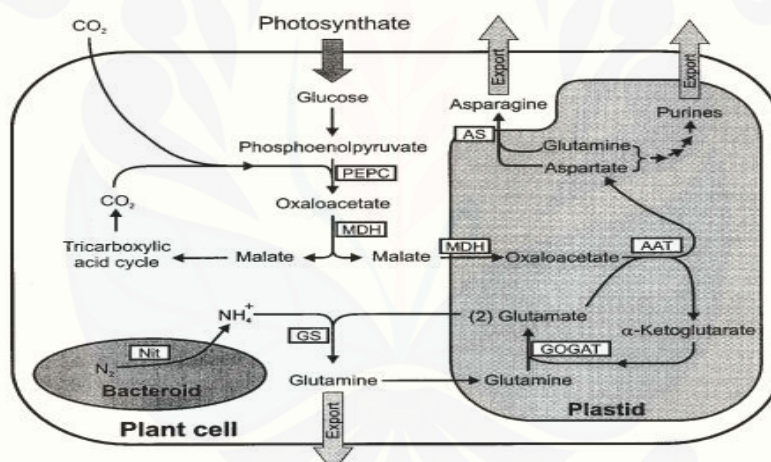
Metabolisme karbohidrat menyediakan rangka karbon dan feredoksin untuk asimilasi nitrat. Penghambatan fotosintesis mencegah produksi Fdred yang dibutuhkan untuk reduksi nitrit di kloroplas yang mengakibatkan akumulasi nitrat dan nitrit. (Commichau *et al.*, 2006). Asimilasi nitrat harus seimbang dengan ketersediaan karbon. Telah diketahui sebelumnya bahwa jumlah struktural karbohidrat tetap konstan sedangkan kandungan gula dan pati menurun secara drastis. Enzim-enzim yang berperan dalam metabolisme karbon yang secara langsung diregulasi oleh nitrat dan bertanggungjawab dalam penurunan ini adalah fosfenolpiruvat karboksilase dan sukros fosfat sintase (Matsumoto *et al.*, 2010). Metabolisme karbon dan nitrogen yang seimbang satu sama lain mengurangi efek toksik dari metabolit nitrat (Balotf dan Kavooosi, 2011).

2.6 Glutamine synthetase (GS) dan Glutamate synthase (GOGAT)

Penelitian menggunakan radiolabeled (¹³N) dan isotop stabil nitrogen (¹⁵N), inhibitor enzim dan metabolisme nitrogen tanaman mutan mengindikasikan bahwa asimilasi utama NH₄⁺ menjadi asam amino terjadi melalui aksi gabungan glutamin synthetase dan glutamat synthase (juga disebut glutamat 2-oksoglutarat

aminotransferase/GOGAT) (Temple *et al.*, 1998). Enzim GOGAT telah ditemukan di bakteri *Aerobacter aerogenes* pada 1970 dan juga telah dideteksi di bakteri pemfiksasi nitrogen. Isozim GS ditemukan di sitosol (GS1) dan kloroplas serta plastid (GS2) (Ohyama, 2010).

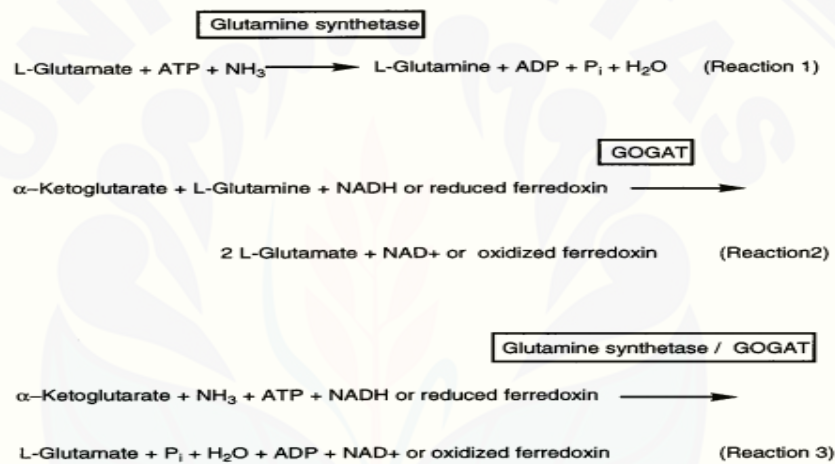
Gambar 2.8 menunjukkan siklus GS/GOGAT dalam asimilasi nitrogen yang terdapat pada nodul akar legume yang berkaitan dengan rantai karbon. Rantai karbon diperlukan untuk reaksi awal asimilasi NH_4^+ yang disediakan oleh α -ketoglutarat dan oksaloasetat. Metabolisme siklus asam trikarboksilik berkaitan erat dengan asimilasi nitrogen dan metabolisme karbon. Fotosintesis menyediakan rangka karbon untuk biosintesis asam amino melalui glikolisis dan siklus asam trikarboksilik. Substansial karbon juga dapat diperoleh dari fiksasi CO_2 non-fotosintetik melalui fosfoenolpiruvat (Temple *et al.*, 1998).



Gambar 2.8 Siklus GS/GOGAT dalam Asimilasi Nitrogen Pada Akar Legume.

Ammonium pertama kali digabungkan menjadi grup amida glutamine oleh GS di akar padi. Jalur ini sama seperti yang ditemukan di nodul kedelai (Ohyama, 2010). Proses reaksi siklus GS/GOGAT dapat dilihat dalam Gambar 2.9. Reaksi 1 yang dikatalisis oleh glutamin sintetase melibatkan *ATP-dependent amination* glutamat untuk menghasilkan glutamin. Reaksi 2 menunjukkan GOGAT kemudian mengkatalisis transfer grup amida dari glutamin dan α -ketoglutarate untuk menghasilkan dua molekul glutamat (Temple *et al.*, 1998) yang terjadi di plastida (Ohyama, 2010). Proses ini membutuhkan feredoksin yang mampu

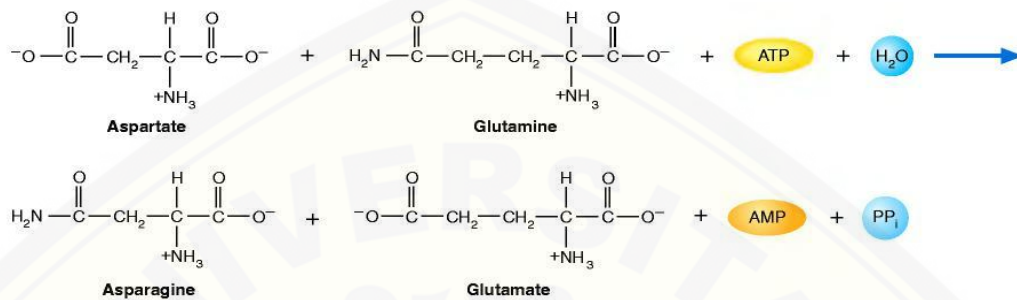
menyumbang 2 elektron yaitu ferredoxin di kloroplas dan NADH atau NADPH di proplastid sel-sel non fotosintesis McKee (2004). Reduction ferredoxin (FDred) dan oxidized ferredoxin (FDox) menunjukkan bentuk reduksi dan oksidasi ferredoxin. Ferredoxin merupakan sebuah protein besi sulfur non-heme (FeS) dan memerankan peran dalam oksidasi-reduksi melalui transfer elektron. NAD(P)H baik NADH atau NADPH digunakan sebagai pereduksi (Ohyama, 2010). Dua reaksi ini (reaksi 1 dan 2) secara kolektif disebut siklus glutamin sintetase/siklus GOGAT yang dikenal sebagai jalur utama asimilasi nitrogen (NH_4^+) pada tanaman (Temple *et al.*, 1998).



Gambar 2.9 Siklus Glutamat Sintase. Reaksi 1 dikatalisasi oleh glutamin sintetase, reaksi 2 dikatalisasi oleh glutamat sintase, reaksi 3 merupakan net keseimbangan metabolis dan *cost* energi siklus GS/GOGAT.

Glutamat yang disintesis dapat digunakan untuk mengisi lagi *pool* glutamat untuk katalisis glutamin sintetase selanjutnya (Temple *et al.*, 1998). McKee (2004) menyatakan glutamat yang lain dapat diubah secara langsung menjadi protein, klorofil, asam nukleat dan sebagainya. Selain membentuk glutamat, glutamin dapat menyumbangkan gugus amidanya menjadi bentuk senyawa yang mengandung N misalnya untuk sintesis aspartat dan asparagin yang dikatalisasi oleh aspartat aminotransferase asparagin sintase (Temple *et al.*, 1998; McKee, 2004). Asam-asam amino ini adalah senyawa transport nitrogen yang penting bagi banyak tanaman (Temple *et al.*, 1998). Inhibisi dari proses

sintesis glutamin mengakibatkan penurunan produksi asam amino (Balotf dan Kavooosi, 2011). Energi untuk mendorong reaksi diperoleh dari hidrolisis ATP menjadi AMP dan PPi (McKee, 2004). Proses pembentukan asparagin dapat dilihat pada Gambar 2.10



Gambar 2.10 Pembentukan Asparagin yang Dikatalisis Oleh Asparagin Sintetase.

GOGAT tersedia dalam dua isoform pada tanaman tingkat tinggi, yaitu NADH-GOGAT dan *ferredoxin-dependent* GOGAT (Fd-GOGAT). Keduanya berbeda dalam hal masa molekul, komposisi sub unit, kinetik enzim, antigenik dan spesifikasi reduktan, dan fungsi metabolik. Fd-GOGAT mengkatalisis asimilasi NH_4^+ yang berasal dari reduksi nitrat yang terpengaruh cahaya dan NH_4^+ yang dihasilkan selama fotorespirasi. NADH-GOGAT terutama ditemukan pada jaringan non-hijau tanaman misalnya dari akar legume dan kultur sel padi. Pada tanaman padi NADH-GOGAT bertanggung jawab untuk sintesis glutamat dari glutamin yang ditransport dari jaringan yang mengalami senesen ke spikelet (Temple *et al.*, 1998).

GS mempunyai afinitas yang sangat tinggi untuk ammonium dan dapat bekerja pada konsentrasi ammonium yang rendah (Ohyama, 2010). Enzim ini tergantung atas inhibisi timbal balik oleh produk berbeda dari metabolisme glutamin, serta oleh alanin dan glisin (Miller *et al.*, 2007; Jamtgard *et al.*, 2008). Menurut Sahrawy *et al.*, (2004), terjadinya peningkatan sintesis sukrosa akan menginduksi aktivitas GS. Dengan semakin tingginya aktivitas GS maka semakin banyak jumlah ammonium yang dikondensasikan dengan glutamat menjadi

glutamin, sehingga jumlah amonium dalam daun menjadi lebih rendah. Amonium tidak pernah ditemukan tertimbun di suatu tempat tertentu dalam tubuh tumbuhan karena dapat menghambat pembentukan ATP di kloroplas maupun mitokondria yang dapat bertindak sebagai pemecah senyawa reaksi dan mempengaruhi respirasi pada konsentrasi rendah (Temple *et al.*, 1998), menyebabkan ekstrusi proton (dimana hal ini berkaitan dengan penyerapan amonium), perubahan pH di sitosol dan pelepasan/gangguan pada proses fotofosforilasi di tanaman (Wang *et al.*, 2007). Amonium bersifat racun sehingga harus segera diubah menjadi glutamin yang dikatalisis oleh GS (Sahrawy *et al.*, 2014).

2.7 Hipotesis

Berdasarkan studi pustaka yang telah dilakukan maka dapat diambil hipotesis untuk percobaan ini adalah :

1. Aplikasi nitrogen dan molibdenum yang diberikan mampu meningkatkan aktivitas enzim nitrat reduktase pada padi hitam hingga taraf tertentu.
2. Aplikasi nitrogen dan molibdenum dengan taraf yang tepat mampu menghasilkan pertumbuhan dan hasil tanaman terbaik pada padi hitam.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Percobaan ini dilaksanakan pada bulan Februari 2017 sampai dengan Agustus 2017 bertempat di *Green House* Gedung CDAST dan Laboratorium CDAST Universitas Jember.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan – bahan yang digunakan untuk percobaan adalah benih padi hitam Bantul, pasir non-nutrisi, larutan Hoagland dan Arnon (1950), H_2MoO_4 sebagai sumber molibdenum, NH_4Cl , KNO_3 , dan $CaNO_3$ sebagai sumber nitrogen, KOH, HCl, buffer ekstraksi dan reaksi enzim, reagen DNS (Dinitrosalicylic acid), reagen Bradford, resolsinol, dan metanol. Peralatan yang digunakan dalam percobaan dan pengukuran adalah timba plastik berdiameter bawah 12 cm, *potray*, spektrofotometer, sentrifus, *dry block*, vortex, pH meter, neraca digital, penggaris, dan peralatan laboratorium pendukung.

3.3 Rancangan Percobaan

Percobaan ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial 2 faktor. Faktor pertama adalah taraf nitrogen dengan 4 taraf dan faktor kedua adalah taraf molibdenum dengan 4 taraf. Total kombinasi perlakuan adalah 16 kombinasi dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga total satuan percobaan sebanyak 48 plot. Tiap ulangan terdiri dari 6 tanaman sehingga total populasi tanaman adalah 192 tanaman. Dari 192 tanaman tersebut diambil sampel untuk analisis enzim dan pengamatan pertumbuhan padi hitam.

Taraf yang digunakan untuk perlakuan nitrogen mengacu pada penelitian Sriwidarni (2009) dan taraf molibdenum yang digunakan mengacu berdasarkan Hoagland dasar untuk tanaman padi. Tanaman padi ditanam pada media pasir dengan komposisi larutan Hoagland (Lampiran 1) yang dimodifikasi unsur nitrogen dan molibdenumnya sesuai dengan perlakuan. Perlakuan nitrogen dan molibdenum yang diberikan sebagai berikut :

N0 = kontrol (0,4 mM)

M0 = kontrol (0 mg/l)

N1= 3,2 mM

M1= 0,01 mg/l

N2= 6,4 mM

M2= 0,02 mg/l

N3= 12,8 mM

M3= 0,03 mg/l

Rumus persamaan RAL faktorial :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ij} : respon atau nilai pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-i dari nitrogen dan taraf ke-j dari molibdenum.

μ : mean populasi.

α_i : pengaruh taraf ke-i nitrogen.

β_j : pengaruh taraf ke-j molibdenum.

$(\alpha\beta)_{ij}$: pengaruh taraf ke-i nitrogen dan taraf ke-j molibdenum.

e_{ijk} : pengaruh acak dari satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan nitrogen ke-i dan molibdenum ke-k.

ijk : 1,2,....

Model yang digunakan dalam rancangan adalah model acak (random) dengan rumus penentuan nilai harapan kuadrat tengah yang dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Penentuan Sumber Keragaman dan Rumus Ekspektasi Kuadrat Tengah Model Random

Sumber Keragaman	DB	E (KT)
Perlakuan	(ab-1)	$\sigma_e^2 + r \sigma_T^2$
A(nitrogen)	(a-1)	$\sigma_e^2 + r \sigma_{AB}^2 + r b \sigma_A^2$
B(molibdenum)	(b-1)	$\sigma_e^2 + r \sigma_{AB}^2 + r a \sigma_B^2$
AB (nitrogen x molibdenum)	(a-1)(b-1)	$\sigma_e^2 + r \sigma_{AB}^2$
Error	(ab-1)(r-1)	σ_e^2

Data yang diperoleh dari hasil percobaan dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA). Apabila terdapat perbedaan yang nyata pada variabel

pertumbuhan dan hasil diuji lanjut dengan menggunakan Uji Duncan 5% untuk mencari kombinasi perlakuan terbaik. Untuk menentukan taraf optimum nitrogen dan molibdenum terhadap aktivitas enzim nitrat reduktase digunakan metode analisis regresi polinomial.

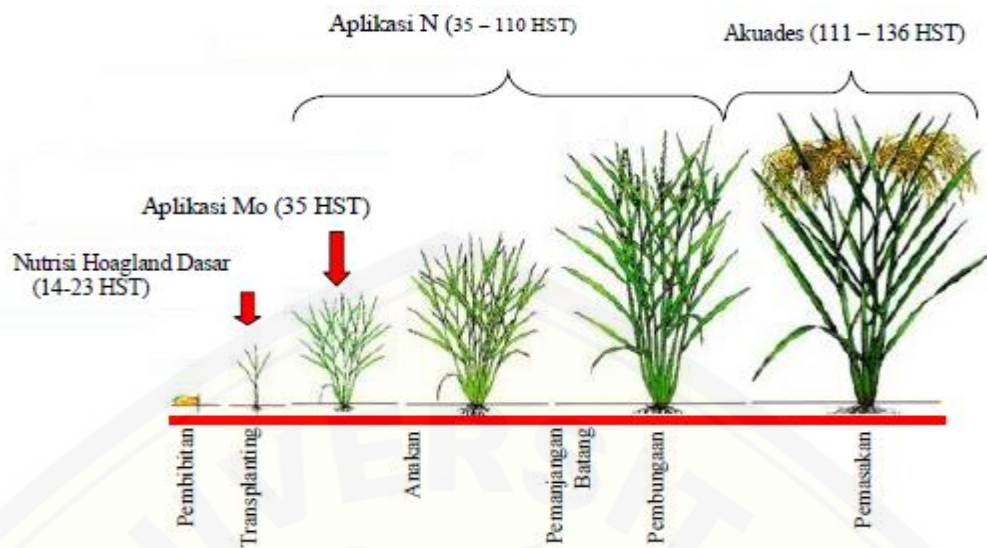
3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1 Persiapan Bibit Tanaman Padi

Benih padi hitam dimasukkan ke dalam klip plastik berlubang dan direndam dalam larutan fungisida-hormon selama 24 jam. Benih padi selanjutnya dibilas dengan air dan diperam dalam kertas tisu basah lalu ditutup dengan plastik hitam dan kain tebal agar hangat atau dimasukkan ke dalam oven yang bersuhu 30°C. Benih yang telah berkecambah disebar di atas media semai dalam tray yaitu tanah dan cocopeat basah lalu ditutupi dengan pasir. Tutup media dengan plastik hitam lalu simpan selama 2 hari hingga benih muncul tunas (2-3 cm). Selanjutnya tray dipindah ke tempat terbuka sampai daun berwarna hijau dengan tinggi bibit kira-kira 15 cm (Lampiran 4a).

3.4.2 Pemindahan dan Pemeliharaan Tanaman

Bibit yang tumbuh baik dan seragam dipindahkan ke dalam pot yang berisi media pasir non nutrisi dan larutan nutrisi Hoagland dengan penambahan amonium 0,4 mM (Handoyo dan Sugiharto, 2016) dengan pH yang dijaga 6,0 (Lampiran 4b) dengan menambahkan KOH atau HCl. Penambahan amonium 0,4 mM merupakan kebutuhan N minimum tanaman padi untuk dapat tumbuh. Larutan Hoagland dasar diberikan selama ± 2 minggu hingga tanaman tumbuh baik dan seragam lalu diberikan nitrogen dan molibdenum sesuai dengan perlakuan yang terlampir pada Lampiran 1 dan Lampiran 2 dengan cara ditambahkan pada larutan nutrisi. Perlakuan kontrol hanya menerima pemberian larutan nutrisi Hoagland minimum (0,4 mM N). Penyiraman nutrisi dilakukan sesuai dengan kondisi yang diperlukan oleh tanaman padi. Teknis pemberian perlakuan dapat lebih jelas dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Waktu Pemberian Perlakuan Nitrogen dan Molibdenum Pada Padi Hitam

3.4.3 Pemanenan

Pemanenan tanaman padi dilakukan apabila padi sudah menunjukkan kriteria panen yaitu 95% gabah sudah menguning dan daun bendera telah mengering atau usia sudah cukup berdasarkan deskripsi varietas. Biasanya umur optimal malai 30 – 35 hari terhitung sejak hari sesudah berbunga (HSB). Kadar air berkisar 21 – 26% dan kerontokan gabah sekitar 16 – 30% (cara mengukurnya dengan meremas malai dengan tangan). Pemanenan padi dilakukan dengan menggunakan sabit/gunting dengan cara memotong batang padi yang siap panen.

3.5 Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan cara melakukan pengukuran dan analisis terhadap aktivitas enzim, variabel pertumbuhan serta hasil tanaman padi hitam. Pengukuran variabel yang diamati mencakup poin-poin di bawah ini :

- a. Aktivitas enzim nitrat reduktase ($\text{mM nitrit} \cdot \mu\text{g protein}^{-1}$)

Pengujian aktivitas nitrat reduktase (NR) dilakukan pada 2 bulan sesudah perlakuan dengan sampel yang diambil dari daun padi. Proses ekstraksi sampel (Lampiran 4d-4f) dimulai dengan menimbang daun padi hitam dan ditambahkan nitrogen cair, PVV, dan seasand kemudian digerus

hingga halus. Sampel ditambahkan larutan buffer PTE sebanyak 3x sampel. Hasil ekstraksi ditampung pada appendorf dalam box es kemudian disentrifugasi 5 menit pada 10.000 rpm. Cairan hasil filtrasi yang sudah disentrifugasi diambil sebanyak 0,5 ml dan 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 nikotinamida adenine dinukleotida (NADH) (Lampiran 4g). Campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 0, 15, dan 30 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan 1 ml 1% sulfanilamide dalam 1,5 N asam klorida dan 0,02% N-Naptildiamin diklorida. Campuran dikocok dan diinkubasi selama 30 menit untuk melihat perubahan warnanya. Nitrit yang terbentuk dicek menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Lampiran 4h). Aktivitas NR dihitung dengan dibandingkan dengan kurva standar nitrit.

Pengukuran kandungan protein dilakukan dengan metode Bradford. 10 μl sampel ditambahkan dengan 1 ml larutan Bradford lalu divortex. Campuran diinkubasi 10 menit pada suhu ruang. Kandungan protein diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

b. Variabel pertumbuhan yang diamati dalam percobaan mencakup berikut :

1) Kandungan sukrosa dan gula reduksi daun ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

Kandungan sukrosa dianalisis sesudah tanaman berumur 2 bulan. Sukrosa diekstraksi menggunakan metanol. Sampel daun padi digerus menggunakan mortar alu setelah dibekukan dengan nitrogen cair sampai menjadi tepung. Tepung sampel kemudian disuspensikan dengan methanol 96%, dikocok lalu disentrifugasi selama 1 menit. Supernatan diambil lalu dikeringkan di dri-block suhu 70°C hingga benar-benar kering. Pelet yang tersisa disuspensikan kembali menggunakan metanol hingga volume 1,5 ml. Suspensi dipanaskan di dry block 70°C selama 1 jam lalu disentrifugasi 5 menit. Supernatan diambil dan dikeringkan seperti sebelumnya. Pelet disuspensikan lagi hingga berwarna putih. Supernatan kering disuspensikan dengan akuades hingga 500 μl , divortex sebentar lalu disentrifugasi selama 5 menit.

Pengujian kandungan sukrosa menggunakan metode resolsinol. Supernatan sebanyak 250 μl ditambah NaOH 0,5N 100 μl dan divortek, kemudian dipanaskan 100°C selama 10 menit. Supernatan dilakukan pewarnaan dengan menambahkan resolsinol sebanyak 250 μl dan HCl 30% 750 μl . Supernatan diinkubasi selama 8 menit pada suhu 80°C. Setelah dingin, absorbansi diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Kandungan gula reduksi diukur dengan menggunakan metode DNS. Supernatan sebanyak 500 μl ditambah 500 μl reagen DNS, kemudian dipanaskan 100°C selama 10 menit. Setelah dingin absorbansi diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 560 nm.

2) Kandungan klorofil ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Kandungan klorofil tanaman dianalisis 2 bulan sesudah perlakuan. Daun yang digunakan untuk sampel adalah daun muda yang sudah berkembang penuh (*youngest fully expanded leaves*) karena dianggap produktif dan mampu menyuplai fotosintat penuh bagi pertumbuhan dan hasil tanaman. Pengukuran kandungan klorofil dilakukan dengan menggunakan metode Wintermans dan De Mots. Ekstrak daun diambil sebanyak 40 μl dan ditambah ethanol 96% sebanyak 960 μl . Larutan disentrifugasi 1 menit, supernatan diambil dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 649 nm dan 665 nm. Kandungan klorofil ditentukan dengan rumus berikut :

a). Klorofil a = $(13,7 \times \text{Abs}_{665}) - (5,76 \times \text{Abs}_{649}) = \mu\text{g klorofil}\cdot\text{g}^{-1}$

b). Klorofil b = $(25,8 \times \text{Abs}_{649}) - (7,60 \times \text{Abs}_{665}) = \mu\text{g klorofil}\cdot\text{g}^{-1}$

c). Klorofil total = Klorofil a + Klorofil b = $\mu\text{g klorofil}\cdot\text{g}^{-1}$

- 3) Laju pertumbuhan tanaman ($\text{cm}\cdot\text{minggu}^{-1}$), diukur dengan menghitung perubahan tinggi tanaman tiap minggu. Tinggi tanaman diukur setelah tanaman mendapatkan respon perlakuan hingga tanaman berhenti tumbuh/stagnan. Pengukuran tinggi tanaman diukur mulai dari permukaan tanah hingga ujung daun tertinggi.
- 4) Jumlah anakan, dihitung berdasarkan jumlah anakan yang terbentuk pada setiap sampel.

- 5) Jumlah malai, dihitung berdasarkan jumlah malai yang terbentuk pada setiap sampel.
- 6) Panjang malai (cm), diukur berdasarkan rata-rata dari panjang malai yang terbentuk pada tiap tanaman sampel dari pangkal hingga ujung.
- 7) Berat basah brangkasan (g)

Berat basah tanaman mencerminkan akumulasi fotosintesis maupun penyerapan hara dalam bentuk senyawa organik penyusun seluruh jaringan pada organ vegetatif maupun generatif tanaman (Turmudhi, 2002). Berat basah diukur dengan cara menimbang seluruh bagian tanaman di atas tanah segera setelah panen.

- c. Variabel hasil yang diamati dalam percobaan ini adalah berat gabah per tanaman (g). Dilakukan dengan menghitung berat gabah total per tanaman sesudah panen.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil percobaan dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa :

1. Taraf optimum nitrogen terhadap aktivitas NR selama 1 jam adalah 12.4 mM sebesar 2,824 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M0); 10,022 mM sebesar 2,946 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M1); 9,562 mM sebesar 3.009 mM nitrit/ $\mu\text{g protein}$ (M2); dan 10,239 mM sebesar 3,022 mM nitrit/ $\mu\text{g protein}$ (M3). Taraf optimum molibdenum terhadap aktivitas NR selama 1 jam adalah 0.012 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 0.728 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N0); 0,019 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2,328 mM nitrit· $\mu\text{g protein}$ (N1); 0,017 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2.545 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N2); dan 0,008 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2.725 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N3). Taraf optimum nitrogen terhadap aktivitas NR selama 2 jam adalah 9,711 mM sebesar 2,542 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M0); 10,646 mM sebesar 3,07 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M1); 9,7 mM sebesar 3,199 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M2); dan 12,618 mM sebesar 3,036 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (M3). Taraf optimum molibdenum terhadap aktivitas NR selama 2 jam adalah 0.0126 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 0,528 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N0); 0,019 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2,128 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N1); 0,012 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 2,696 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N2); dan 0,022 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sebesar 3,068 mM nitrit· $\mu\text{g protein}^{-1}$ (N3).
2. Taraf terbaik nitrogen dan molibdenum terhadap pertumbuhan tanaman padi hitam terdapat pada perlakuan N2M1. Taraf terbaik nitrogen dan molibdenum terhadap hasil tanaman padi hitam terdapat pada perlakuan N1M1, N1M2, dan N1M3.

5.2 Saran

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, perlu dilakukan percobaan lanjutan terhadap taraf optimum nitrogen dan molibdenum yang diperoleh terhadap aktivitas enzim asimilasi nitrogen, pertumbuhan dan hasil pada tanaman padi hitam.

DAFTAR PUSTAKA

- Australian Society of Plant Scientist, New Zealand Society of Plant Biologists dan New Zealand Institute of Agricultural and Horticultural Science. 1999. *Plants in Action. Adaptation in Nature, Performance in Cultivation*. Australia : Macmillan Education Australia Pty Ltd.
- Bala, P. dan Hossain, S. M. A. 2008. Yield and Quality of Rice as Affected by Molybdenum Applied With Chemical Fertilizers and Organic Matter. *Agriculture & Rural Development*. 1 (1&2) : 19 – 23.
- Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. 2009. Beras Hitam, Pangan Berkhasiat yang Belum Populer. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 31 (2) : 9 – 10.
- Balotf, S. dan Kavooosi, G. 2011. Diferential Nitrate Accumulation, Nitrate Reduction, Nitrate Reductase Activity, Protein Production and Carbohydrate Biosynthesis in Response to Potassium and Sodium Nitrate. *African Journal of Biotechnology*. 10 (78) : 17973 – 17980.
- Barabas, N.K. Omarov, R.T., Erdei, L. dan Lips, S.H. 2000. Distribution of the Mo-enzymes Aldehyde Oxidase, Xanthine Dehydrogenase and Nitrate Reductase in Maize (*Zea maysL.*) Nodal Roots as Affected by Nitrogen and Salinity. *Plant Science*.155 (1) : 49 - 58.
- Better Crops International. 2002. *Special Supplement*. 16 : 22 – 25.
- Bittner, F. 2014. Molybdenum Metabolism in Plants and Crosstalk to Iron. *Frontiers in Plant Science*. 5 (28) : 1 – 6.
- Blumenthal, Baltensperger, Cassman, Mason dan Pavlista. 2008. Importance and Effect of Nitrogen on Crop Quality and Health. *Agronomy & Horticulture*. 2 : 50 – 70.
- California Department of Food And Agriculture. 2011. *Rice Nitrogen Uptake And Partitioning*. http://apps.cdfa.ca.gov/frep/docs/N_Rice.html [diakses 5 Maret 2017].
- Campbell, W. H. 1999. Nitrate Reductase Structure, Function and Regulation :Bridging the Gap Between Biochemistry and Physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50 : 277 – 303.
- Campbell, W. H. 2001. Structure and Function of Eukaryotic NAD(P)H: Nitrate Reductase. *Cellular and Molecular Life Science*. 58 : 194 – 204.

- Campbell, N.A. and J. B. Reece. 2002. *Biology*. Sixth Edition. San Francisco : Pearson Education. Inc.
- Choi, S. P., Kang, M. Y., Koh, H. J., Nam, S. H., & Friedman, M. 2007. Antiallergic Activities of Pigmented Rice Bran Extracts in Cell Assays. *Journal of Food Science*. 72 (9) : 719 – 726.
- Commichau, F. K., Forchhammer, K., dan Stulke, J. 2006. Regulatory Links Between Carbon and Nitrogen Metabolism. *Current Opinion in Microbiology*. 9 : 167 - 172.
- Crawford, N. M. 1995. Nitrate : Nutrient and Signal for Plant Growth. *The Plant Cell*. 7 : 859 – 868.
- Daubresse, Vedele, Dechorgnant, Chardon, Gaufichon, dan Suzuki. 2010. Nitrogen Uptake, Assimilation and Remobilization in Plants : Challenges For Sustainable Agriculture. *Annals of Botany*. 105 : 1141 – 1157.
- Davenport, S., Lay, P. L., dan Tamburrino, P. S. 2015. Nitrate Metabolism in Tobacco Leaves Overexpressing Arabidopsis Nitrite Reductase. *Plant Physiology and Biochemistry*. 97 : 96 – 107.
- Elser, Bracken, Cleland, Gruner, Harpole, Hillebrand, Ngai, Seabloom, Shurin, dan Smith. 2007. Global Analysis of Nitrogen and Phosphorus Limitation of Primary Producers in Freshwater, Marine, and Terrestrial Ecosystems. *Ecology Letters*. 10 : 1135 – 1142.
- Enroth, Eger, Okamoto, Nishino, dan Pai. 2000. Crystal Structures of Bovine Milk Xanthine Dehydrogenase and Xanthine Oxidase : Structure-Based Mechanism of Conversion. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 97 (20) : 10723 - 10728.
- Fageria, N. K., Santos, A. B. D., dan Moraes, M. F. 2010. Influence of Urea and Ammonium Sulfate on Soil Acidity in Lowland Rice Production. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 41 : 1565 – 1575.
- Fischer, Barbier, Hecht, Mendel, Campbell, dan Schwarz. 2005. Structural Basis of Eukaryotic Nitrate Reduction : Crystal Structures of the Nitrate Reductase Active Site. *The Plant Cell*. 17 : 1167 – 1179.
- Foyer C.H, Parry, M dan Noctor, G. 2003. Markers and Signals Associated With Nitrogen Assimilation in Higher Plants. *Experimental Botany*. 54 : 585-593.
- Galib, M. 2015. Effect of Flooding on Nitrate Reductase Activities of Seedling of Some Indonesian Local Rice Varieties. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*. 4 (5) : 26 – 31.

- Genenger, M., Zimmermann, S., Frossard, E., dan Brunner, I. 2003. The Effects of Fertiliser or Wood Ash On Nitrate Reductase Activity in Norway Spruce Fine Roots. *Forest Ecology and Management*. 175 : 413-423.
- Gomez, K. A. dan Gomez, A. A. 1995. *Prosedur Statistik Untuk Penelitian Pertanian*. Jakarta : UI-Press.
- Hakim, Nyakpa, Lubis, Nugroho, Saul, Diha, Hong, Bailey. 1986. *Dasar-Dasar Ilmu Tanah*. Universitas Lampung.
- Handoyo, T. dan Sugiharto, B. 2016. Effect of Nitrate And Ammonium on Nitrogen Assimilation Enzymes During Growth of Rice. *Conference Proseeding. International Symposium on Life Science & Biological Engineering*.
- Hemalatha, S. 2002. Regulation of Nitrate Reductase Activity in Rice (*Oryza sativa L.*) by Growth Regulators. *Central European Agriculture*. 3 (3) : 231 – 238.
- Hewitt, E.J. (1975). Assimilatory Nitrate-Nitrite Reduction. *Annual Review of Plant Physiology*. 26 : 73 - 100.
- Hoagland, D. R. dan Arnon, D. I. 1950. *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*. University of California.
- Huffon C.A., Besford, R.T., Wellburn, A.R. 1996. Effects of NO (+NO₂) Pollution on Growth, Nitrate Reductase Activities and Associated Protein Contents in Glasshouse Lettuce Grown Hydroponically in Winter With CO₂ Enrichment. *New Phytologist*. 133 : 495 - 501.
- Ichikawa, H., Ichiyangi, T., Xu, B., Yoshii, Y., Nakajima, M., & Konishi, T. (2001). Antioxidant Activity of Anthocyanin Extract From Purple Black Rice. *Journal of Medicinal Food*. 4 (4) : 211 - 218.
- International Molybdenum Association. 2013. *Plants Need Molybdenum*.
- IRRI. 2002. Nitrogen (N) Excess. <http://www.knowledgebank.irri.org/training/fact-sheets/nutrient-management/deficiencies-and-toxicities-fact-sheet/item/nitrogen-excess?tmpl=component&print=1> [diakses 16 Oktober 2017].
- Ismunadji, M. dan Dijkshoorn, W. 1971. Nitrogen Nutrition of Rice Plants Measured by Growth and Nutrient Content in Pot Experiments, Ionic Balance And Selective Uptake. *Net Journal of Agricultural Science*. 19 : 223 - 236.

- Jackson, L. E., Burger, M., Cavagnaro, T. R. 2008. Roots, Nitrogen Transformations, and Ecosystem Services. *Annual Review of Plant Biology*. 59 : 341 – 363.
- Jamtgard, S., Nasholm, T., dan Danell, H. K. 2008. Characteristics of Amino Acid Uptake in Barley. *Plant Soil*. 302 : 221 - 231.
- Jang, Park, Kim, Lee, Hwang, Park, Park, dan Kwon. 2012. Black Rice (*Oryza sativa* L.) Extract Attenuates Hepatic Steatosis in C57BL/6 J Mice Fide a High-Fat Diet via Fatty Acid Oxidation. *Nutrition & Metabolism*. 9 (27) : 1 – 11.
- Kaplan, D., Bejerano, N. R., dan Lips, H. 1974. Nitrate Reductase as A Product-Inducible Enzyme. *Federation of European Biochemical Societies*. 49 (2) : 393 – 398.
- Karuwal, R. L. 2012. Distribusi Nitrat Reduktase dan Pengaruh Faktor Fisiologis Terhadap Aktivitas Nitrat Reduktase (ANR) pada Tanaman Cabai (*Capsicum annum* L.). *Bimafika*. 4 : 464 – 468.
- Kristamtini, Taryono, Basunanda, Murti, Supriyanta, Widyayanti, dan Sutarno. 2012. *Morphological of Genetic Relationships Among Black Rice Landraces from Yogyakarta and Surrounding Areas*. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*. 7 (12) : 982 – 989.
- Kyaing, M.S., Guo, H., Cheng, H., 2012. Nitrite Reductase (nir2) Gene Has a Positive Role in Nitrogen Metabolism in Tobacco. *Afr. J. Biotechnol*. 11, 13645 - 13655.
- Latifa, I. C. dan Anggarwulan, E. 2009. Kandungan Nitrogen Jaringan, Aktivitas Nitrat Reduktase, dan Biomassa Tanaman Kimpul (*Xanthosoma sagittifolium*) Pada Variasi Naungan dan Pupuk Nitrogen. *Nusantara Bioscience*. 1 : 65 – 71.
- Lee, J., R. W. Durst and R. E. Wrolstad. 2005. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *AOAC International*, 88 (5) : 1269 - 1278.
- Li, X. Z. dan Oaks, A. 1994. Induction and Turnover of Nitrate Reductase in *Zea Mays* (Influence of Light). *Plant Physiology*. 106 (3) : 1145 – 1149.
- Li, Y. dan Wang, X. 2013. Root-induced Changes in Radial Oxygen Loss, Rhizosphere Oxygen Profile, and Nitrification of Two Rice Cultivars in Chinese Red Soil Regions. *Plant Soil*. 365 : 115 – 126.

- Llamas, A., Kalakoutskii, K. L., dan Fernandez, E. 2000. Molybdenum Cofactor Amounts in *Chlamydomonas reinhardtii* Depend on the *Nit5* Gene Function Related to Molybdate Transport. *Plant, Cell and Environment*. 23 : 1247 – 1255.
- Luque, Ampudia, Llamas, Galvan, dan Fernandez. 2015. Understanding Nitrate Assimilation and Its Regulation in Microalgae. *Front Plant Science*. 6 : 1 – 17.
- Malolepsza, U. 2007. Nitric Oxide Production in Plants. *Postepy Biochem*. 53 (3) : 263 - 71.
- Mangiri, J., Mayulu, N., dan Kawengian, S. E. S. 2015. Gambaran Kandungan Zat Gizi Pada Beras Hitam (*Oryza sativa L.*) Kultivar Pare Ambo Sulawesi Selatan. Universitas Sam Ratulangi Manado.
- Masumoto, Miyazawa, Ohkawa, Fukuda, Taniguchi, Murayama, Kusano, Saito, Fukayama, dan Miyao. 2010. Phosphoenolpyruvate Carboxylase Intrinsically Located in the Chloroplast of Rice Plays a Crucial Role in Ammonium Assimilation. *PNAS*. 107: 5226 - 5231.
- Maulida, D.A. R. dan E. Arisoelaningsih. 2013. Dinamika Struktur Komunitas Tumbuhan Liar dan Pertumbuhan Padi Hitam di Sawah Organik Kecamatan Kepanjen Kabupaten Malang. *Biotropika*. 1 (5) : 1 - 6.
- McKee, T. 2004. *Biochemistry : The Molecular Basis Of Life, 3rd Edition*. New York : Mc Graw Hill.
- Mendel, R.R. dan R. Hansch. 2002. Molybdoenzymes and Molybdenum Cofactor in Plants. *Experimental Botany* 53 : 1689 – 1698.
- Meyer, Lea, Provan, Kaiser, dan Lillo. 2005. Is Nitrate Reductase a Major Player in the Plant NO (Nitric Oxide) Game?. *Photosynthesis Research*. 83 : 181 - 9.
- Miller, Fan, Orsel, Smith, Wells. 2007. Nitrate Transport and Signaling. *Experimental Botany*. 58 : 2297 - 2306.
- Miswar. 2013. Respon Enzim Metabolisme Senyawa Nitrogen Pada Tanaman Tembakau Transgenik yang Membawa Gen Sucrose Phosphate Synthase (SPS) Tebu (*Saccharum officinarum L.*). *Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS*.
- Moraes, Reis, Moraes, Junior, Vivian, Cabral, Malavolta. 2009. Effects of Molybdenum, Nickel, and Nitrogen Sources on the Mineral Nutrition and

- Growth of Rice Plants. *Communication in Soil and Plant Analysis*. 40 : 3238 – 3251.
- Munzarova, Lorenzen, Brix, Vojtiskova, dan Votrubova. 2006. Effect of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ Availability on Nitrate Reductase Activity and Nitrogen Accumulation in Wetland Helophytes *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Environmental and Experimental Botany*. 55 : 49 – 60.
- Nicholas, D. J. D., Nason, A. dan McElroy, W. D. 1953. Molybdenum and Nitrate Reductase : I. Effect of Molybdenum Deficiency on The Neurospora Enzyme. *Biological Chemistry*. 207 : 341 – 352.
- Ohyama, T. 2010. Nitrogen Assimilation in Plants. *Research Signpost*. 37 (2) : 1 – 17.
- Potash & Phosphate Institute. 1995. *International Soil Fertility Manual*. USA.
- Putri, D. P. 2015. Ekstraksi Antosianin Beras Hitam (*Oryza sativa L.*) dengan Berbagai Pelarut dan Stabilitasnya Pada Suhu Tinggi. *Tesis*. Universitas Gadjah Mada.
- Pengkumsri, Chaiyasut, Saenjurn, Sirilun, Peerajan, Suwannalert, Sirisatha, dan Sivamaruthi. 2015. Physicochemical and Antioxidative Properties of Black, Brown and Red Rice Varieties of Northern Thailand. *Food Science and Technology*. 35 (2) : 331 – 338.
- Rahman, M. M., Takahisa, A., Ttauohiko, S. 2009. Nitrogen Effecting and Recovery from N Fertilizer Under Rice-Based Cropping Systems. *Academy of Criminal Justice Sciences*. 3 (6) : 336 - 351.
- Roesmarkam, A. dan Yuwono, N. W. 2002. *Ilmu Kesuburan Tanah*. Yogyakarta : Kanisius.
- Sa'adah, I. R., Supriyanta, dan Subejo. 2013. Keragaman Warna Gabah dan Warna Beras Varietas Loksar Padi Beras Hitam (*Oryza sativa L.*) yang Dibudidayakan Oleh Petani Kabupaten Sleman, Bantul, dan Magelang. *Vegetalika*. 2 (3) : 13 – 20.
- Sahrawy, M., A'vila, C., Ana, C., Ca'novas, F.M., dan George, J. L. 2004. Increased Sucrose Level and Altered Nitrogen Metabolism in *Arabidopsis thaliana* Transgenic Plants Expressing Antisense Chloroplastic Fructose-1,6-Bisphosphatase. *Experimental Botany*. 55 : 2495–2503.
- Samyuni. 2015. Toleransi Varietas Padi Hitam (*Oryza sativa L.*) Pada Berbagai Tingkat Cekaman Kekeringan. *Tesis*. Universitas Sebelas Maret.

- Santamaria, P., Elia, A., Serio, F., Todaro, E. 1999. A Survey of Nitrate Andoxalate Content in Retail Fresh Vegetables. *Science of Food and Agriculture*. 79 : 1882–1888.
- Schulte, E. E. 2004. *Soil and Applied Molybdenum*. University of Wisconsin.
- Shankar, N., Khan, S. R., dan Srivastava, H. S. 2001. The Responses of Nitrate Reductase Activity and Nitrate Assimilation in Maize Roots to Growth Regulators at Acidic pH. *Biologia Plantarum*. 44 (4) : 599 – 601.
- Shirani, S., Mahdavi, F., dan Maziah, M. 2011. Morphological Abnormality Among Regenerated Shoots of Banana and Plantain (*Musa spp.*) after in Vitro Multiplication with TDZ and BAP from Excised Shoot Tips. *African Journal of Biotechnology*. 8 (21) : 5755 – 5761.
- Sismiyati, R., dan Partohardjono, S. 1994. Status Hara N Padi Sawah di Dalam Kaitanya dengan Efisiensi Pupuk. *Penelitian Pertanian*. 14 (1) : 3 - 8.
- Sompong, R., Siebenhandl, E. S., Linsberger, M. G., dan Berghofer, E. 2011. Physicochemical and Antioxidative Properties of Red and Black Rice Varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry*. 124 (1) : 132 - 140.
- Suhartini, T dan Suardi, D. 2010. Potensi Beras Hitam Lokal Indonesia. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 32 (1) : 9 - 10.
- Suttle, J. 1986. Cytokinin-Induced Ethylene Biosynthesis in Nonsenescing Cotton Leaves. *Plant Physiology*. 82 : 930 – 935.
- Suzuki, A., dan Knaff, D. B. 2005. Glutamate Synthase : Structural, Mechanistic and Regulatory Properties, and Role in the Amino Acid Metabolism. *Photosynthesis Research*. 83: 191-217.
- Takahashi, M., Sasaki, Y., Ida, S., Morikawa, H., 2001. Nitrite Reductase Gene Enrichment Improves Assimilation of NO₂ in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 126 : 731-741.
- Tayefe, Gerayzade, Amiri, dan Nasrollah. 2014. Effect of Nitrogen on Rice Yield, Yield Components and Quality Parameters. *African Journal of Biotechnology*. 13 (1) : 91 – 105.
- Temple, S., Vance, C. P., dan Gantt, S. 1998. Glutamate Synthase and Nitrogen Assimilation. *Plant Sciences*. 3 (2) : 51 – 56.
- Turmodhi E. 2002. Produktivitas Kedelai-Jagung Pada Sistem Tumpangsari Akibat Penyiangan dan Pemupukan Nitrogen. *Akta Agrosia*. 5 (1) : 22 - 26.

- Vanoni, Dossena, Heuvel, dan Curti. 2005. Structure Function Studies on the Complex Iron-Sulfur Flavoprotein Glutamate Synthase : The Key Enzyme of Ammonia Assimilation. *Photosynthesis Research*. 83: 219-38.
- Wang, Han, Zhang, Xia, Zhu, Ma, Hou, Tang, dan Ling. 2007. Supplementation of Black Rice Pigment Fraction Improves Antioxidant and Anti-Inflammatory Status in Patients With Coronary Heart Disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 16 (1) : 295 – 301.
- Wang, M. Y., Siddeqi, M. Y., Ruth, T. J. 1993. Ammonium Uptake by Rice Roots. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ Influx Across the Plasmalemma. *Plant Physiology*. 103: 1259–1267.
- Wang, Yuan, Ou, Lin, dan Zhang. 2007. Glutamine Synthetase and Glutamate Dehydrogenase Contribute Differentially to Proline Accumulation in Leaves of Wheat (*Triticum aestivum*) Seedlings Exposed to Different Salinity. *Plant Physiology*. 164: 695 – 701.
- Watts, D.B., Torbert, H.A., Prior, S.A., Huluka, G. 2010. Long-term Tillage and Poultry Litter Impacts Soil Carbon and Nitrogen Mineralization and Fertility. *Soil Science Society American Journal*. 74. 1239–1247.
- Weir, R. G. 2004. *Molybdenum Deficiency in Plants*. AGFACTS. NSW Department of Primary Industries.
- Yoneyama, T. 1991. Uptake Assimilation and Translocation of Nitrogen by Crops. *Assisted Reproduction and Genetics*. 25 (2) : 75 - 82.
- Zabala, J. S., Murua, C. G., dan Marino, D. 2015. Mild Ammonium Stress Increases Chlorophyll Content in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*. 10 (3) : 1 – 3.
- Zhang, Huajun, Wang, Deng, Song, Makeen, Shen, dan Xu. 2010. Partial Nitrate Nutrition Amends Photosynthetic Characteristics in Rice (*Oryza sativa* L. var. japonica) Differing in Nitrogen Use Efficiency. *Plant Growth Regulation*. 63 : 235 – 242.
- Hua, Y., Liu, Y. B., dan Zhang, X. S. 2011. Auxin-Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. *Molecular Plant*. 4 (4) : 616 - 625.

LAMPIRAN 1

Komposisi Larutan Nutrisi Hoagland dan Arnon (1950) dan Volume Pengambilan (ml) dalam 1 Liter

Larutan		N0 (0,4 mM)	N1 (3,2 mM)	N2 (6,4 mM)	N3 (12,8 mM)
I	Nitrat	0,25	2	4	8
	Amonium	0,4	3,2	6,4	12,5
II		3,95	3,6	3,21	2,4
III		2	1,8	1,6	1,2
IV		2	2	2	2
V		2	2	2	2

Sumber : Sriwidarni (2009).

Keterangan :

Larutan I : 50,6 g KNO_3 dan 35,5 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dalam 1 liter akuades
26,73 g NH_4Cl dalam 1 liter akuades

Larutan II : 37,3 g KCl dalam 200 ml akuades

Larutan III : 22,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 ml akuades

Larutan IV : 24,7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 ml

Larutan V : 15,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
12 mg Fe-EDTA
7 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
10 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ } dalam 100 ml

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

LAMPIRAN 2

Pembuatan Larutan Stok Molibdenum dan Volume Pengambilan (ml) dalam 1 Liter

Larutan molibdenum didapat dengan membuat larutan stok dari penimbangan H_2MoO_4 sebanyak 0,1 g = 100 mg/L

Volume pengambilan Mo (ml) dalam 1 liter larutan :

$$\text{a. } M_0 = \frac{0 \text{ mg/L} \times 1000 \text{ ml}}{100 \text{ mg/L}} = 0 \text{ ml}$$

$$\text{b. } M_1 = \frac{0,01 \text{ mg/L} \times 1000 \text{ ml}}{100 \text{ mg/L}} = 0,1 \text{ ml}$$

$$\text{c. } M_2 = \frac{0,02 \text{ mg/L} \times 1000 \text{ ml}}{100 \text{ mg/L}} = 0,2 \text{ ml}$$

$$\text{d. } M_3 = \frac{0,03 \text{ mg/L} \times 1000 \text{ ml}}{100 \text{ mg/L}} = 0,3 \text{ ml}$$

LAMPIRAN 3

Hasil Analisis Ragam Seluruh Variabel Percobaan

a. Aktivitas Nitrat Reduktase (1 jam)

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	15	22.46	1.50 ^{tn}	0.19	3.01	4.96
Nitrogen	3	21.08	7.03 ^{tn}	0.89	3.86	6.99
Molibdenum	3	0.39	0.13 ^{tn}	0.02	3.86	6.99
N x Mo	9	0.99	0.11 ^{**}	7.90	2.54	3.78
Error	32	0.22	0.01			
Total	47	22.69				

b. Aktivitas Nitrat Reduktase (2 jam)

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	15	27.97	1.86 ^{**}	11.63	3.01	4.96
Nitrogen	3	25.20	8.40 ^{**}	52.37	3.86	6.99
Molibdenum	3	1.33	0.44 ^{tn}	2.76	3.86	6.99
N x Mo	9	1.44	0.16 ^{**}	5.99	2.54	3.78
Error	32	0.43	0.027			
Total	47	28.40				

c. Kandungan Sukrosa Daun

SK	DB	JK	KT	FHit	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	15	24948.09	1663.21 ^{tn}	1.04	3.01	4.96
N	3	2772.58	924.19 ^{tn}	0.58	3.86	6.99
M	3	7822.34	2607.45 ^{tn}	1.63	3.86	6.99
NxM	9	14353.17	1594.80 ^{**}	16468.28	2.54	3.78
Error	32	1.55	0.10			
Total	47	24949.64				

d. Kandungan Gula Reduksi Daun

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	15	1011.58	67.44 ^{tn}	0.94	3.01	4.96
N	3	99.91	33.30 ^{tn}	0.46	3.86	6.99
M	3	266.49	88.83 ^{tn}	1.24	3.86	6.99
NxM	9	645.19	71.69 ^{**}	190.97	2.54	3.78
Error	32	6.01	0.38 ^{tn}			
Total	47	1017.59				

e. Kandungan Klorofil Total

SK	db	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F tabel 1%
Perlakuan	15	209971.79	13998.12 ^{tn}	0.77	3.01	4.96
Nitrogen	3	27028.13	9009.38 ^{tn}	0.49	3.86	6.99
Molibdenum	3	18482.72	6160.91 ^{tn}	0.34	3.86	6.99
N x Mo	9	164460.95	18273.44 ^{**}	41.44	2.54	3.78
Error	32	7054.83	440.93			
Total	47	217026.63				

f. Laju Pertumbuhan

SK	DB	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	15	1.51	0.10 ^{tn}	2.53	3.01	4.96
N	3	1.12	0.37 ^{**}	9.42	3.86	6.99
M	3	0.03	0.01 ^{tn}	0.26	3.86	6.99
NxM	9	0.36	0.04 ^{tn}	2.18	2.54	3.78
Error	32	0.29	0.02			
Total	47	1.81				

g. Jumlah Anakan

SK	DB	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	15	889.97	59.33 ^{**}	7.01	3.01	4.96
N	3	750.59	250.20 ^{**}	29.54	3.86	6.99
M	3	63.16	21.05 ^{tn}	2.49	3.86	6.99
NxM	9	76.22	8.47 ^{tn}	0.97	2.54	3.78
Error	32	140.00	8.75			
Total	47	1029.97				

h. Jumlah Malai

SK	db	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F tabel 1%
Perlakuan	15	607.97	40.53 ^{tn}	1.67	3.01	4.96
Nitrogen	3	250.34	83.45 ^{tn}	3.44	3.86	6.99
Molibdenum	3	139.34	46.45 ^{tn}	1.92	3.86	6.99
N x Mo	9	218.28	24.25 [*]	2.89	2.54	3.78
Error	32	134.50	8.41			
Total	47	742.47				

i. Panjang Malai

SK	db	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F tabel 1%
Perlakuan	15	92.05	6.14 ^{tn}	2.55	3.01	4.96
Nitrogen	3	65.67	21.89 ^{**}	9.09	3.86	6.99
Molibdenum	3	4.71	1.57 ^{tn}	0.65	3.86	6.99
N x Mo	9	21.68	2.41 ^{tn}	1.01	2.54	3.78
Error	32	38.24	2.39			
Total	47	130.29				

j. Berat Segar

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	15	18949.12	1263.27 ^{tn}	2.94	3.01	4.96
N	3	13557.66	4519.22 ^{**}	10.52	3.86	6.99
M	3	1525.22	508.41 ^{tn}	1.18	3.86	6.99
NxM	9	3866.24	429.58 ^{tn}	1.29	2.54	3.78
Error	32	5339.23	333.70			
Total	47	24288.36				

k. Berat Gabah

SK	DB	JK	KT	F Hit	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	15	8.91	0.59 [*]	12.17	3.01	4.96
N	3	3.60	1.20 ^{**}	24.55	3.86	6.99
M	3	4.03	1.34 ^{**}	27.53	3.86	6.99
NxM	9	1.28	0.14 [*]	2.92	2.54	3.78
Error	32	0.78	0.05			
Total	47	9.69				

LAMPIRAN 4

Dokumentasi pelaksanaan penelitian

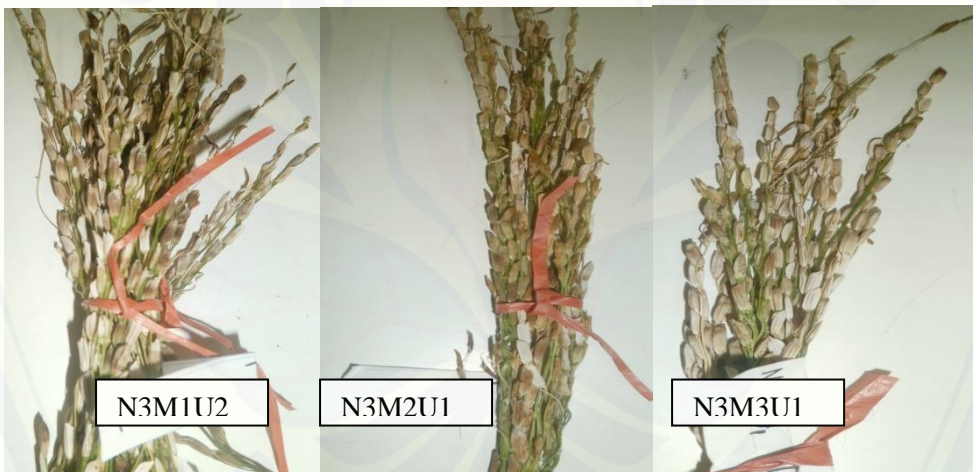
a. Bibit padi hitam Bantul



b. Pindah tanam



b. Contoh Hasil Panen Gabah Padi Hitam pada N3



d. Penimbangan Sampel



e. Pemberian nitrogen cair



f. Penggerusan Sampel



g. Analisis Enzim



h. Spektrofotometer

