

# PENGARUH LENGAS TANAH TERHADAP AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE DAN GLUTAMIN SINTETASE BEBERAPA VARIETAS KACANG TANAH

*The Influence of Soil Moisture on Nitrate Reductase and and  
glutamine synthetase activity in Several Varieties of Peanut*

Wawan Sulistiono<sup>1</sup>, Hari Hartiko<sup>2</sup>, dan Taryono<sup>3</sup>

*Program Studi Agronomi  
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada*

## ABSTRACT

The experiment of the effects of soil moisture on nitrate reductase activity (NRA) and glutamine synthetase activity (GSA) in several varieties of peanut was conducted in the green house and in the Molecular Laboratory-Jember University. The treatments were the combination factors of soil moisture level and peanut variety. The first factor was watering interval to the field capacity (FC), consisted of 2 days interval (L1), 4 days interval (L2), 6 days interval (L3), 8 days interval (L4). The second factors was peanut variety consisted of Gajah (V1), Anoa (V2), Macan (V3), and Kelinci variety (V4).

The results shown that 1) NRA was influenced more by soil humidity than GSA, 2) GSA had positive correlation with NRA ( $r = 0,667^*$ ) at 24 days after planting but no correlation had been found from both of them at 47 days after planting, 3) NRA could be used as selection marker of drought resistance varieties. NRA of Kelinci variety was high at low soil humidity, and implied that Kelinci variety was more resistant to drought.

Keywords: soil humidity – NR activity – GS activity – peanut variety

## PENGANTAR

Kacang tanah (*Arachis hypogaea* L. Merr) merupakan tanaman pangan sumber protein nabati yang cukup penting. Pada pembudidayaannya, faktor lengas tanah seperti kekeringan akan mempengaruhi pertumbuhan dan produktivitas (Purnomo dkk, 2000).

Kekeringan mempengaruhi aktivitas enzim jalur asimilasi nitrat (Crawford *et al.*, 2000). Salah satu enzim kunci asimilasi nitrat adalah nitrat reduktase (Claussen dan Lenz, 1999). Beberapa hasil penelitian

1) Jambewangi Krajan RT 05/11, Sempu Banyuwangi Jawa Timur

2) Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

3) Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

menunjukkan bahwa pengaruh kekeringan menurunkan ANR sebesar 4,47-6,69 %. Kekeringan diduga akan mempengaruhi enzim jalur asimilasi nitrat berikutnya yaitu glutamin sintetase (GS).

Enzim merupakan molekul protein dan memiliki potensi untuk dipakai sebagai penanda/penciri seleksi, dengan mengamati ekspresinya. Ekspresi NR dapat dilihat dengan mengkaji aktivitas spesifiknya seperti yang dilakukan oleh Smarelli dan Chambell (1981) pada jagung, kedelai, dan ketimun; Cherel *et al.* (1986) pada jagung, kedelai, tembakau, sorgum dan rumput-rumputan.

Penanda seleksi dengan menggunakan aktivitas NR dan GS ber-alasan. Hal ini dikarenakan: 1) Tanaman kacang tanah menyerap nitrat yang akan meningkatkan aktivitas NR. Aktivitas NR tersebut berkorelasi dengan peningkatan nitrat tanah, 2)  $\text{NH}_4^+$  yang dihasilkan dari mekanisme reduksi nitrat, oleh GS digunakan sebagai substrat untuk membentuk glutamin guna pembentukan asam-asam amino lainnya untuk menyusun protein/enzim (Coruzzi dan Last, 2000).

Selain faktor lingkungan, aktivitas enzim NR disebabkan perbedaan varietas. Dari beberapa hasil penelitian dilaporkan bahwa struktur NR sendiri berbeda antar spesies tanaman (Smarelli dan Chambell, 1981; Cherel *et al.*, 1986). Setiyono (1999) menemukan bahwa perbedaan varietas akan memberikan perbedaan ANR. Hal tersebut diperkirakan juga terjadi pada perbedaan varietas kacang tanah yang dicobakan.

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh kelengasan tanah terhadap aktivitas NR dan GS pada beberapa varietas kacang tanah.

## CARA PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di rumah kaca dan Laboatorium Biologi Molekuler Universitas Jember dari bulan Januari-Mei 2003. Varietas kacang tanah yang digunakan terdiri atas: Gajah, Anoa, Macan dan Kelinci. Pelaksanaan percobaan di rumah kaca dilakukan dengan rancangan acak lengkap. Varietas kacang tanah ditumbuhkan pada media tanam dalam polibag ukuran berat 14 kg.

Tanah yang digunakan jenis Regosol. Pada awal penanaman, tanah dipupuk dengan Urea dengan dosis 50 kg/ha, SP-36 100 kg/ha dan KCl 100 kg/ha.

Perlakuan interval penyiraman sampai kapasitas lapangan dilaksanakan untuk mendapatkan perbedaan kandungan lengas tanah. Interval penyiraman terdiri atas : L1 (2 hari), L2 (4 hari), L3 (6 hari) dan L4 (8 hari). Kandungan lengas tanah diukur secara gravimetri pada masing-

masing kondisi paling kering sesuai interval penyiraman.

Pengamatan dilakukan terhadap aktivitas spesifik NR dan GS (unit aktivitas enzim per miligram protein). Aktivitas spesifik NR dan GS diamati pada umur 24 dan 47 hari. Protein/enzim yang akan diukur aktivitasnya, didapatkan dengan menggerus 3 gram daun segar masing-masing varietas dengan mortal pada suhu 4°C hingga didapatkan ekstrak daun. Selama proses penggerusan, ditambahkan nitrogen cair untuk memudahkan penghancuran, dan *buffer* ekstraksi sebanyak 9 ml (tiga kali berat daun). *Buffer* ekstraksi terdiri dari 50 mM tris-HCL (pH 7,5), 0,5 mM EDTA, 5mM (-mercaptoetanol dan 10% polivinilpirolidon (Schmidt dan Mohr (1989). Ekstrak daun disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit suhu 4°C. Cairan sampel (enzim) dipisahkan dari endapan. Sampel ini digunakan untuk mengukur aktivitas spesifik enzim nitrat reduktase (NR), glutamin sintetase (GS), dan total protein terlarut (TPT).

Analisis enzim NR menggunakan metode yang digunakan Sugiarto dan Sugityama (1992). Cairan sampel (enzim ) sebanyak 600 µl ditambahkan pada larutan pengujian yang mengandung 500µl *buffer* K-fosfat 0,1 M, 200µl  $\text{KNO}_3$  0,1M, 100µl NADH 5 mM dan 500µl  $\text{H}_2\text{O}$  sehingga volume akhir 2ml. Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C. Inkubasi dihentikan dengan menambahkan 1ml 1 % sulfanilamid dalam 1,5 N asam klorida dan 1ml 0,02 % *N-Naphthylenediamine dichloride* sehingga terjadi perubahan warna menjadi merah jambu sebagai tanda adanya ANR. Nitrit yang terbentuk dibandingkan dengan standar NR, diukur pada panjang gelombang 540. Standar NR 1mM  $\text{NaNO}_2$ .

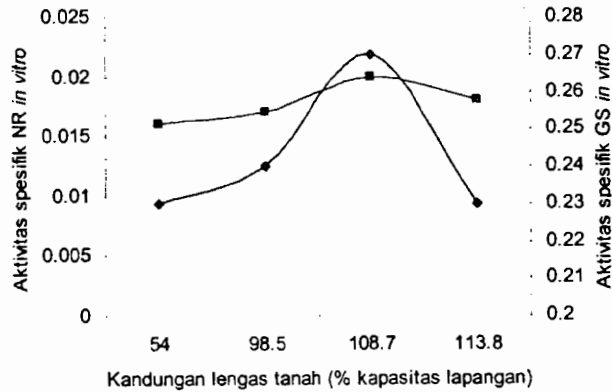
Analisis enzim GS menggunakan metode yang digunakan Sugiarto dan Sugityama (1992). Cairan sampel (enzim) sebanyak 200 µl ditambahkan pada larutan pengujian yang mengandung 500 µl Reagen Mixture (200 µM Tris, 66 µM Na-arsenat, 130 µM L-glutamin, 5 µM  $\text{MnCl}_2$  dengan pH 6,4), 100µl ADP 0,34 µM, 100µl  $\text{NH}_2\text{OH}$  0,6 M dan 100µl  $\text{H}_2\text{O}$  hingga volume akhir 1ml, diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C. Inkubasi dihentikan dengan menambahkan 1 ml  $\text{FeCl}_3$  dalam 2 N HCl dan 1 ml 4 % trikloroasetat (TCA), dicampur hingga homogen (di vortek) dan didinginkan ± 10 menit. Hasil reaksi yang terbentuk dibandingkan dengan standar GS, diukur pada panjang gelombang 500 nm. Standar GS menggunakan glutamyl hydroxamate.

Kandungan protein total daun diukur menggunakan metode Bradford (Deutscher, 1990) yaitu mengambil sampel (enzim) hasil sentrifugasi sebanyak 5µl, selanjutnya ditambahkan 1 ml larutan Bradford. Protein terlarut didiamkan ± 1 jam dan diukur pada panjang gelombang 595 nm.

# HASIL PENELITIAN

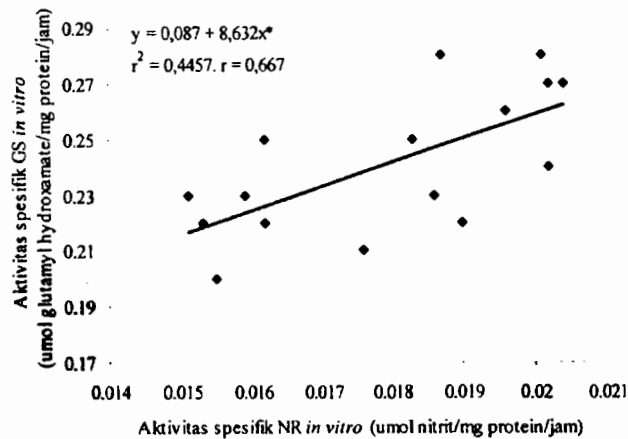
## Hubungan aktivitas NR dan GS

Aktivitas NR dan GS umur 24 hari. Aktivitas NR menurun pada penurunan kandungan lengas tanah dan mencapai aktivitas terendah pada kondisi paling kering (54,0 % KL). Kecenderungan ini berbeda dengan aktivitas GS yang terendah pada lengas 113,8 % KL. Kandungan lengas tanah sekitar 100 % KL (108,7 % KL) menghasilkan aktivitas NR dan GS tertinggi (Gambar 1).



Gambar 1. Rerata ANR dan AGS beberapa varietas kacang tanah pada umur 24 hari

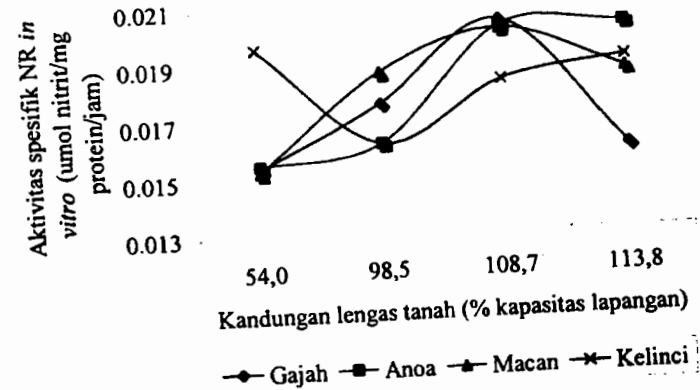
Kedua Aktivitas NR dan GS tersebut berkorelasi sebesar  $r = 0,667^*$  (Gambar 2). Aktivitas NR daun menentukan sebesar 45 % terhadap aktivitas GS daun dan peningkatan 1 unit aktivitas NR daun, meningkatkan 8,633 unit aktivitas GS.



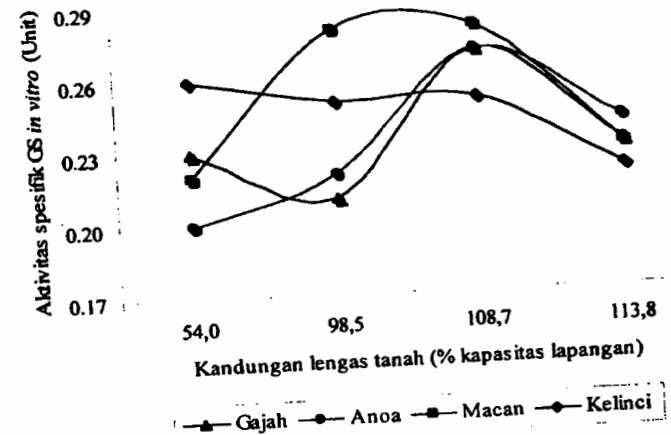
Gambar 2. Hubungan ANR dan AGS beberapa varietas kacang tanah umur 24 hari

Aktivitas NR dan GS masing-masing varietas menunjukkan bahwa perbedaan varietas menyebabkan perbedaan aktivitas NR dan GS. Varietas yang memiliki aktivitas GS tinggi tidak selalu dipicu oleh tingginya aktivitas NR daun. Hal ini terlihat pada varietas Gajah pada kandungan lengas tanah tertinggi ataupun terendah (Gambar 3 dan 4).

Tingginya aktivitas GS varietas Kelinci pada kandungan lengas 54,0 % KL, Anoa pada kandungan lengas tanah 113,8 % KL dan varietas Macan pada kandungan lengas tanah 98,5 % KL dipengaruhi oleh tingginya aktivitas NR (Gambar 3 dan 4).



Gambar 3. Aktivitas spesifik NR ((mol nitrit /mg protein /jam) beberapa varietas kacang tanah umur 24 hari

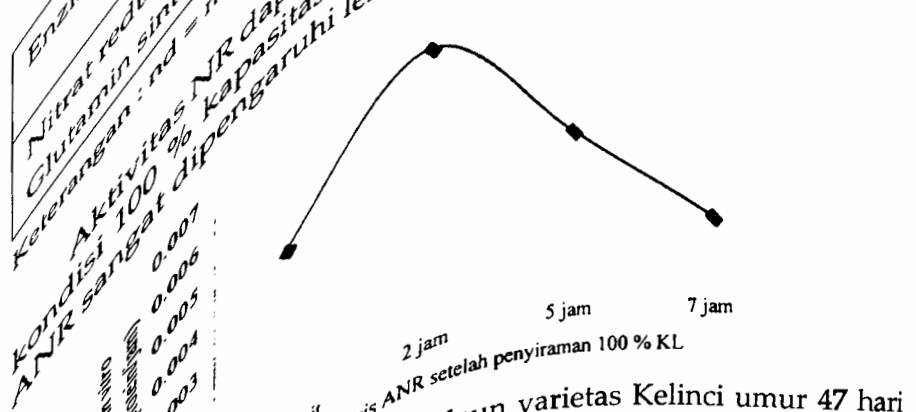


Gambar 4. Aktivitas spesifik GS ((mol glutamyl hydroxamate/mg protein/jam) beberapa varietas kacang tanah umur 24 hari

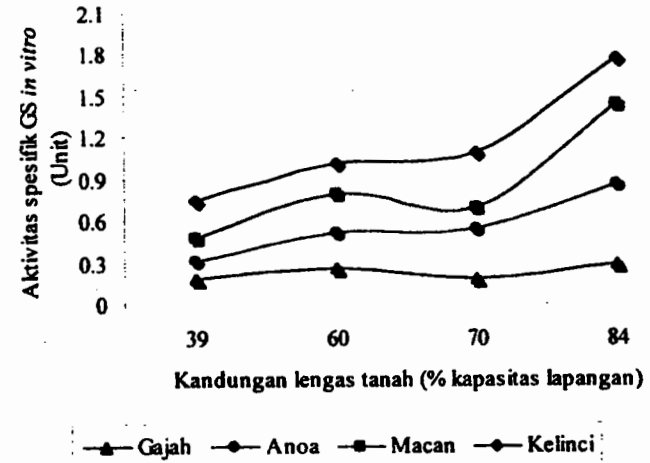
500  
**Aktivitas NR dan GS umur 47 hari**  
 Tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas GS aktif dan NR tidak terdeteksi. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas GS tidak tergantung aktivitas NR.  
 Tabel 1. Aktivitas spesifik GS dan aktivitas NR rerata beberapa varietas kacang tanah umur 47 hari

| Enzim                   | Kandungan lengas tanah (% kapasitas lapangan) |       |       |
|-------------------------|---|-------|-------|
|                         | 84  | 70    | 60    |
| Nitrat reduktase (NR)   | nd  | nd    | nd    |
| Glutamin sintetase (GS) | 0,441   | 0,273 | 0,254 |
|                         |   |       | 0,187 |

Keterangan : nd = non detectable menunjukkan aktivitas NR tidak terdeteksi  
 Aktivitas NR dapat terdeteksi ketika kandungan lengas tanah pada kondisi 100 % kapasitas lapangan (Gambar 5). Hal ini menunjukkan ANR sangat dipengaruhi lengas tanah.



Gambar 5. Aktivitas spesifik NR daun varietas Kelinci umur 47 hari setelah disiram sampai kapasitas lapang  
 Gambar 5. Aktivitas spesifik NR daun varietas Kelinci umur 47 hari setelah disiram sampai kapasitas lapang  
 an memperbandingkan Tabel 1 dan Gambar 5 diketahui bahwa aktivitas GS tidak dipicu oleh substrat NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dari reduksi nitrat. Hal ini dikarenakan pada saat yang sama, aktivitas NR daun memiliki aktivitas GS yang tetap tinggi pada lengas tanah 84 % dan aktivitas GS lainnya menurun. Pada lengas 84 % ini terjadi peningkatan aktivitas GS



Gambar 6. Aktivitas spesifik GS ((mol glutamyl hydroxamate/mg protein/jam) beberapa varietas kacang tanah umur 47 hari

### Hubungan aktivitas NR dan GS

Aktivitas NR dan GS umur 24 hari berkorelasi sebesar  $r = 0,668^*$  (Gambar 1). Hal ini dikarenakan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> yang dihasilkan dari reduksi nitrat oleh enzim NR dan nitrit reduktase (NiR) adalah substrat enzim GS. Produk NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tersebut selanjutnya akan segera direduksi oleh enzim GS (Coruzzi dan Last 2000). Aktivitas NR tersebut menentukan aktivitas GS sebesar 45 %.

Hubungan aktivitas NR dan GS tidak selalu mengikuti pola tersebut. Ini diketahui dari pengamatan kedua enzim umur 47 hari yang menunjukkan aktivitas NR tidak terdeteksi ketika aktivitas GS terdeteksi (Tabel 1). Hal ini menjelaskan bahwa substrat untuk aktivitas GS daun tidak tergantung dari produk reduksi enzim NR. Hasil ini didukung oleh Clausen dan Lenz (1999) pada tanaman arbei yang menunjukkan bahwa aktivitas NR daun tidak terdeteksi dibanding aktivitas GS. Aktivitas NR terdeteksi pada akar dengan perlakuan nitrat 6 mM.

Pada lengas melebihi 100 % KL (Gambar 1) tidak terlihat aktivitas GS yang meningkat. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada lengas tanah melebihi 100 % KL yang diasumsikan konsentrasi NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tinggi, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tanah tidak memacu aktivitas GS. Hasil ini didukung oleh penelitian Schmidt dan Mohr (1989) yang menemukan bahwa NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> hanya mempunyai peranan kecil sedangkan cahaya yang bekerja pada fitokrom adalah faktor pengatur utama dalam pemunculan aktivitas GS. Rhodes *et al.* (1976) dalam Schmidt dan Mohr (1989) menemukan adanya suatu penurunan aktivitas GS dalam Lemma minor dengan adanya penambahan konsentrasi NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Aktivitas GS masing-masing varietas menunjukkan bahwa varietas Anoa memiliki aktivitas GS tertinggi pada lengas 113,8 % KL. Kecenderungan tersebut dikarenakan tingginya aktivitas NR daun (Gambar 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa varietas Anoa memiliki kemampuan lebih baik dalam menyerap nitrat dibanding varietas Gajah, Macan dan Kelinci. Pada lengas tanah 54,0 % KL, varietas Kelinci memiliki aktivitas GS dan NR daun tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa varietas Kelinci lebih baik dalam menyerap nitrat atau lebih toleran terhadap kekeringan dibanding tiga varietas lainnya. Berkenaan dengan hal tersebut, Purnomo dkk. (2000) menjelaskan bahwa varietas Kelinci memiliki ciri-ciri varietas yang tahan kekeringan antara lain berdaun sempit dan tebal serta perakarannya dalam.

Aktivitas NR lebih dipengaruhi oleh lengas tanah dibanding aktivitas GS. Tabel 1 menunjukkan bahwa pada berbagai tingkat lengas tanah pada umur 47 hari, aktivitas NR tidak terdeteksi. Hal ini dikarenakan gen NR hanya akan dirangsang ketika dalam sel daun terdapat nitrat dan keberadaan nitrat dipengaruhi oleh lengas tanah (Rinsema, 1983 ; Nyakpa dkk, 1988). Penurunan serapan nitrat tanah selanjutnya menurunkan aktivitas NR daun (Kremer, 1983). Nitrat merangsang ekspresi gen NR pada tingkat transkripsi sehingga ekspresi mRNA meningkat dan terjadi sintesis protein NR (Sugiarto dan Sugiayama, 1992; Lea dan Leegood, 1999). Pada umur 47 hari, serapan nitrat oleh perakaran diduga rendah sehingga menurunkan sintesis protein NR dan berakibat aktivitas NR tidak terdeteksi. Rendahnya serapan nitrat diduga karena tanaman memanfaatkan jalur penambatan N<sub>2</sub> bebas untuk sintesis asam-asam amino melalui bintil akar.

Aktivitas NR mampu dideteksi ketika kondisi kandungan lengas tanah 100 % KL (Gambar 5). Perubahan aktivitas NR terjadi secara cepat setelah penyiraman. Hal ini diduga karena terjadi penurunan konsentrasi nitrat dalam jaringan. Shobert dan Komor (1990) menemukan bahwa nitrat dalam jaringan tanaman *Ricinus communis* mengalami jenuh 4 jam setelah penambahan potasium nitrat 1mM dan selanjutnya mengalami penurunan.

Aktivitas GS yang terdeteksi pada umur 47 hari tidak hanya dari reduksi nitrat enzim NR, tetapi dari NH<sub>4</sub><sup>+</sup> internal hasil metabolik seperti fotorespirasi mitokondria (Coruzzi dan Last, 2000) serta aktivitas bintil (Crawford *et al.*, 2000). Asam amino glutamin sebagai salah satu produk aktivitas bintil, akan ditranspor ke sel inang (Schubert, 1986; Lea dan Leegood, 1999; Crawford *et al.*, 2000).

Tingginya aktivitas GS dibanding NR menunjukkan bahwa GS memiliki Km yang kecil terhadap NH<sub>4</sub><sup>+</sup> atau GS memiliki afinitas

terhadap NH<sub>4</sub><sup>+</sup> besar. Hal tersebut untuk mereduksi substrat NH<sub>4</sub><sup>+</sup> yang tinggi dalam sel. Substrat untuk aktivitas GS selain berasal dari proses reduksi nitrat oleh NR juga berasal dari produk photorespirasi mitokondria (Coruzzi dan Last, 2000) ataupun penyerapan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tanah. Ini diketahui dari pengaruh aktivitas NR hanya 45 % menentukan aktivitas GS. Substrat dari beberapa sumber tersebut, akan memacu aktivitas GS lebih tinggi. Hal ini dilakukan karena apabila terjadi akumulasi NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tinggi di dalam sel daun, dapat meracun dan berpengaruh pada kerusakan kloroplas walaupun mekanisme secara jelas belum diketahui (Meher dan Mohn, 1989).

## KESIMPULAN

1. Aktivitas NR lebih dipengaruhi oleh lengas tanah.
2. Aktivitas GS berkorelasi positif dengan NR ( $r = 0,667^*$ ) pada umur 24 hari sedangkan pada umur 47 hari, aktivitas GS dan NR tidak berkorelasi.
3. Aktivitas NR dapat digunakan sebagai penanda seleksi varietas yang tahan kekeringan. Varietas Kelinci pada lengas tanah rendah, memiliki aktivitas NR yang tinggi (tahan kekeringan).

## DAFTAR PUSTAKA

- Cherel, L., A.M. Poll, C. Meyer, C., and P. Rouze, 1986. Immunological comparisons of nitrate reductase of different plant species using monoclonal antibodies. *Plant physiol.* 81: 376-378.
- Claussen, W. and F. Lenz, 1999. Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant and Soil.* 208: 95-102.
- Coruzzi, G. and R. Last, 2000. *Biochemistry and Molecular of Plants: Amino Acids.* American Society of Plant Physiologists.
- Crawford, N.M., M.L. Kahn, T. Leustek, T., and S.R. Long, 2000. *Biochemistry and Molecular of Plants : Nitrogen and Sulfur.* American Society of Plant Physiologists.
- Dautscher, M.P. 1990. *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification.* Academic Press California. USA.
- Kremer, P.J. 1983. *Water Relations of Plants.* Acedemic Press. Inc. London.
- Lea, P.J. and R.C. Leegood, 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology* 2 eds. John Wiley and Sons. New York.

- Nyakpa, M.Y., A.M. Lubis, M.A. Pulung, A.G. Amrah, A. Munawar, A., G.B. Hong, and N. Hakim, 1988. Kesuburan Tanah. Universitas Lampung.
- Meher, I. and H. Mohr, 1989. Ammonium toxicity: description of the syndrome in *Sinapsis alba* and the search for its causation. *Physiologia Plantarum*. 77: 545-554.
- Purnomo, J., N. Nugrahaeni, and A. Kasno, 2000. Keragaman Galur-Galur Kacang Tanah pada Kondisi Cekaman Kekeringan. *Edisi Khusus Balitkabi*. 16:271-285.
- Rinsema, W.T. 1983. Pupuk dan Cara Pemupukan terjemahan Saleh, H.M. Bharatara Karya Aksara. Jakarta.
- Schobert, C. and E. Komor, 1990. Transfer of amino acids and nitrate from the roots into the xylem of *Ricinus communis* seedlings. *Planta*. 181: 85-90.
- Setiyono. 1999. Aktivitas nitrat reduktase daun vegetatif dan bendera hubungannya dengan hasil beberapa varietas padi. *Tesis-S2*. Program Studi Agronomi. Jurusan Ilmu-ilmu Pertanian. Program Pasca Sarjana UGM. Yogyakarta
- Schmidt, S. and H. Mohr, 1989. Regulation of the appearance of glutamine synthetase in mustard (*Sinapsis alba* L.) cotyledons by light, nitrate and ammonium. *Planta* 117: 526534.
- Schubert, K.R. 1986. Produk of biological nitrogen fixation in higher Plants: synthesis, transport, and metabolisme. *Annual Reviews Inc. Plant Physiol*. 37: 539-574.
- Smarelli, J. and W.H. Chambell., 1981. Immunological approach to structure comparisons of assimilatory nitrate reductase. *Plant Physiol*. 68: 1226-1230.
- Sugiarto, B., dan T. Sugiyama, 1992. Effect of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. *Plant Physiology* 98:1405-1408.