



Pengukuran Aktivitas Nitrat Reduktase (ANR) Pada Tanaman Poaceae Secara In vivo

Measurement of Nitrate Reductase Activity (ANR) In vivo in Poaceae

Devi Bunga Pagalla*, & Magfirahtul Jannah

Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Gorontalo, Indonesia

Abstrak

Tanaman jagung, padi dan tebu termasuk dalam keluarga Poaceae yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi sebagai makanan pokok. Nitrat reduktase berperan dalam mereduksi nitrat menjadi amonia. Pengujian aktivitas nitrat reduktase dapat membantu studi bioteknologi, dalam hal ini produksi pupuk atau pengolahan limbah organik, karena enzim nitrat reduktase dapat digunakan untuk mengubah nitrat menjadi senyawa nitrogen yang lebih berguna. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas nitrat reduktase (ANR) dari daun tanaman famili Poaceae yaitu jagung, padi, dan tebu. Pengukuran ANR secara in vivo dilakukan menggunakan metode spektrofotometri dengan dua tipe alat spektrofotometer yaitu Spektrofotometer Vis/UV, Genesys10UV dan Spektrofotometer Visibel, dengan panjang gelombang 540 nm. Kajian ini menyimpulkan bahwa padi memiliki ANR tertinggi yaitu sebesar 0.1503 $\mu\text{mol}/\text{gram}$ berat daun/jam inkubasi. Meningkatnya aktivitas nitrat reduktase menunjukkan bahwa semakin meningkat pula tenaga untuk reduksi nitrat serta memberi kapasitas yang besar untuk sintesis asam amino, protein, atau asimilasi N total.

Kata Kunci: *Zea mays*; *Oryza sativa*; *Saccharum officinarum*; ANR; In vivo; Spektrofotometri

Abstract

Corn, rice, and sugarcane are included in the Poaceae family which have high economic value as staple foods. Nitrate reductase plays a role in reducing nitrate to ammonia. The nitrate reductase activity testing can help biotechnology studies, in this case, fertilizer production or organic waste treatment, because the nitrate reductase enzyme can be used to convert nitrate into more useful nitrogen compounds. The purpose of this study was to analyze the activity of nitrate reductase (ANR) from the leaves of the Poaceae family, namely corn, rice, and sugarcane. In vivo ANR measurements were carried out using the spectrophotometric method with two types of spectrophotometers, namely the Vis/UV Spectrophotometer, Genesys10UV, and Visible Spectrophotometer, with a wavelength of 540 nm. This study concludes that rice had the highest ANR of 0.1503 $\mu\text{mol}/\text{gram}$ leaf weight/hour of incubation. The increase in nitrate reductase activity indicates that the energy for nitrate reduction also increases and provides a large capacity for synthesizing amino acids, proteins, or total N assimilation.

Keywords: *Zea mays*; *Oryza sativa*; *Saccharum officinarum*; ANR; In vivo; Spectrophotometric

How to Cite: Pagalla, D. B. & Jannah, M. (2023). Pengukuran Aktivitas Nitrat Reduktase (ANR) Pada Tanaman Poaceae Secara In vivo. *Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA)*, 5(1) 2023: 40-46

*E-mail: devibungapagalla@una.ac.id



PENDAHULUAN

Keluarga *Poaceae* terdiri dari sekitar 9500 spesies rumput (Simpson, 2019) yang dibudidayakan untuk makanan (misalnya sereal, beras, jagung), tumbuh-tumbuhan, dan rumput. *Poaceae* adalah keluarga tumbuhan yang paling penting secara ekonomi, menyediakan makanan pokok dari tanaman sereal seperti jagung, gandum, beras, barley, dan millet serta pakan untuk hewan penghasil daging. Program pemuliaan tanaman banyak menggunakan nilai ANR sebagai kriteria seleksi tanaman. Pendekatan berdasarkan ANR sebagai kriteria seleksi dapat dipertimbangkan, karena enzim yang dikendalikan oleh gen secara langsung terlibat dalam proses biosintesis protein. Metode spektrofotometri dapat digunakan untuk menganalisis kandungan senyawa, mengukur pertumbuhan baketeri dan mengukur aktivitas suatu enzim (Xu et al., 2011; Murtiyaningsih & Hazmi, 2017). Salah satu enzim yang dapat diukur aktivitasnya secara *in vivo* adalah enzim nitrat reduktase. Pengukuran aktivitas enzim nitrat reduktase merupakan salah satu upaya untuk mengetahui bagaimana metabolisme pada tumbuhan (Ende et al., 2022).

Enzim nitrat reduktase merupakan enzim penting dalam rantai reduksi di mana nitrat diubah menjadi amonia dan berguna dalam pembentukan asam amino, protein, klorofil dan senyawa lain yang mengandung unsur nitrogen, yang sangat penting dalam pertumbuhan vegetatif dan generative tanaman. Aktivitas reduktase nitrat meningkat dengan meningkatnya aplikasi N (Zhang & Shangguan 2007). Ketersediaan N dipengaruhi oleh penambahan bahan organik pada lahan pertanian dengan faktor pembatas utama adalah air, kandungan c-organik yang rendah, dan pH alkalis. Ketersediaan N juga dipengaruhi oleh sistem pertanaman, terutama pada sistem tumpang Sari (Ende et al., 2022). Sebagai unsur hara utama bagi pertumbuhan tanaman, nitrogen pada umumnya sangat diperlukan untuk pembentukan atau pertumbuhan bagian vegetatif tanaman, seperti daun, batang, dan akar sehingga sangat membatasi pertumbuhan tanaman (Adhikari et al., 2021). Kegunaan nitrogen sangat spesifik dalam pembentukan asam amino dan protein (Sari & Prayudyaningsih, 2015), yang memengaruhi kapasitas fotosintesis daun (Urban et al., 2021).

Tanaman menyerap nitrogen dalam bentuk nitrat, garam amonium dan senyawa organik. Penggunaan nitrogen dalam bentuk nitrat memerlukan proses reduksi nitrat dengan hasil antara berupa nitrit dan kemudian terbentuk amonia sebagai hasil akhir. Reduktasi nitrat berlangsung dalam gelap. Menurut Peni & Solichatun (2004) reduksi nitrat pada daun hijau dapat dipercepat dalam keadaan terang, sehingga baik nitrat

maupun CO₂ dapat direduksi dalam reaksi gelap fotosintesis. Pengukuran aktivitas NR diperlukan karena aktivitas NR sering mempengaruhi laju sintesis protein dalam tumbuhan yang menyerap NO₃⁻ sebagai sumber nitrogen utama (Koryati et al., 2021).

Nitrat reduktase (NR) adalah enzim kunci untuk asimilasi nitrogen pada banyak organisme (Chamizo-Ampudia et al., 2017), yang mengkatalisis reduksi nitrat menjadi nitrit pada sel tumbuhan sitoplasma. Nitrat sebagai substrat utama telah terbukti diperlukan untuk pensinyalan seluler dan umumnya didistribusikan di banyak jaringan tanaman (Kolbert et al., 2008; Mastur et al., 2015). NR juga merupakan enzim kunci yang berfungsi sebagai sumber enzimatis penting dari oksida nitrat (NO), yang kemudian mengatur pertumbuhan tanaman dan ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik (Fu et al., 2018). Aktivitas enzim nitrat reduktase (ANR) diketahui mempunyai korelasi yang positif dengan hasil produksi tanaman seperti pada jagung, teh, dan kelapa. Hal ini merupakan peluang yang baik dalam usaha seleksi tanaman yang berdaya hasil tinggi. Rockel et al., (2002) mengemukakan bahwa ANR dapat digunakan sebagai parameter seleksi untuk menduga hasil suatu tanaman. Penggunaan ANR sebagai parameter seleksi dapat diterapkan pada tanaman taraf bibit. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengukur aktivitas enzim nitrat reduktase menggunakan spektrofotometri pada tanaman jagung, tebu dan padi.

METODE PENELITIAN

Sampel daun muda diperoleh dari kebun petani jagung, padi dan tebu sekitar Kampus 4 Universitas Negeri Gorontalo. Sampel daun muda dibersihkan dari debu, dan tulang daun hilangkan kemudian dipotong kecil ± 0,2 mm. Sebanyak 1 gr/botol film (botol gelap) irisan daun, digunakan 3 botol gelap. Masing-masing botol ditambahkan buffer fosfat pH 7,5 sebanyak 5 ml, kemudian di inkubasi selama 20 menit sambil dikocok. Buffer fosfat dikeluarkan diganti dengan 5 ml buffer fosfat + NaNO₃ 100 µl dan diinkubasi selama 60 menit sambil dikocok. Selanjutnya ditambahkan 200 µl larutan 0,02% NED + 200 µl larutan 1% SA dalam 3N HCl. Aliquot hasil rendaman daun diambil 100 µl dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi larutan NED dan SA lalu didiamkan selama 10 menit. Setelah 10 menit campuran larutan aliquot + NED + SA ditambahkan 2,5 ml akuades, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Nilai absorbansi diukur menggunakan Spektrofotometer Vis/UV Genesis10UV dan Spektrofotometer UV-Vis, dengan panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi dari campuran dicatat.

Pembuatan kurva standar NO₂ (Nitrit) digunakan 8 tabung reaksi untuk pembuatan 8 campuran larutan NaNO₂ 60 µM + NED + SA + akuades dengan konsentrasi

nitrit (NO₂⁻) nmol yang digunakan yaitu 0,2,4,8,12,16,20,24 dan 28. Selanjutnya dilakukan pengukuran nilai absorbansi kurva standar NO₂ (nitrit) menggunakan spektrofotometer Vis/UV, Genesis10UV dengan panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi dicatat dan membuat persamaan linear menggunakan aplikasi Microsoft Excel dan mendapatkan nilai R². Penentuan nilai ANR secara in vivo menggunakan rumus:

$$ANR = \mu\text{mol} \times \frac{5 \text{ ml}}{0,1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{60 \text{ menit}}{60 \text{ menit}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran aktivitas nitrat reduktase dari 3 jenis daun menggunakan metode spektrofotometri dengan dua tipe alat spektrofotomer yang digunakan yaitu Spektrofotometer Vis/UV Genesis10UV dan Spektrofotometer Visibel, dengan panjang gelombang 540 nm, diperoleh nilai unit aktivitas nitrat reduktase (ANR) dari 3 sampel daun seperti pada Tabel 1. Nilai absorbansi pada berbagai konsentrasi nitrit ketiga jenis tanaman ditunjukkan dalam Tabel 2.

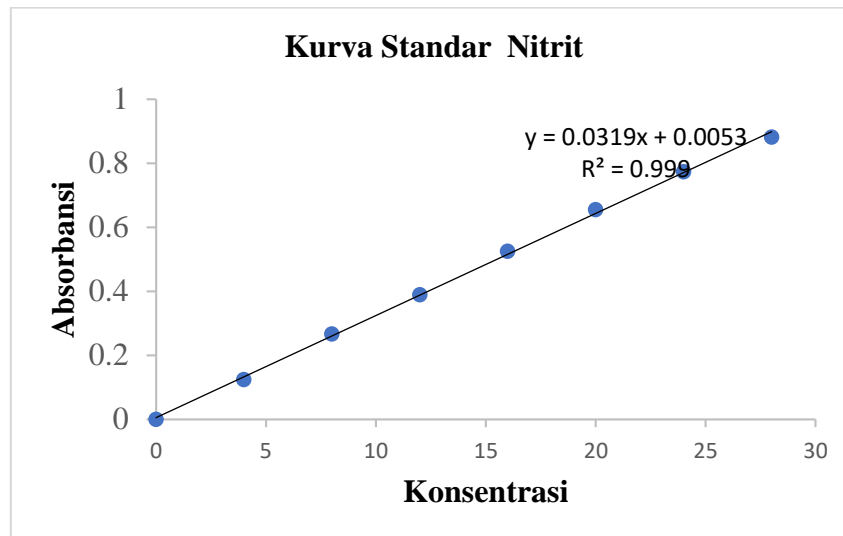
Tabel 1. Hasil Perhitungan ANR pada tiga jenis tanaman

Jenis tanaman	Ulangan Pengukuran	Inkubasi (menit)	Nilai ANR	Rerata ANR	Standar Deviasi (SD)
		(Absorbansi λ540nm)			
Tebu	1	0.016	0.016771	0.019383	0.002082
	2	0.017	0.018339		
	3	0.02	0.023041		
Padi	1	2.37388724	0.118694	0.150346	0.028821
	2	3.145400593	0.15727		
	3	3.50148368	0.175074		
Jagung	1	0.089020772	0.004451	0.009891	0.005211
	2	0.296735905	0.014837		
	3	0.207715134	0.010386		

Tabel 2. Nilai absorbansi pada berbagai konsentrasi NO₂ pada pembuatan kurva standar NO₂

Konsentrasi Nitrit (nM)	Absorbansi λ540 nm		
	Tebu	Padi	Jagung
0	0	0	0
4	0.124	0.219	0.127
8	0.267	0.293	0.252
12	0.389	0.45	0.395
16	0.525	0.554	0.362
20	0.655	0.67	0.645
24	0.773	0.782	0.778
28	0.882	0.922	0.861
		0.9917	
Nilai R	0.999		0.97
Jenis	Spektrofotometer visibel, Genesis, ThermoSpektronik	Spektrofotometer Vis/UV,Genesis10UV,ThermoScientific	

Berdasarkan hasil pengukuran nilai absorbansi (Tabel 2) data tebu digunakan sebagai data yang dianggap paling baik untuk pembuatan kurva standar. Kurva standar nitrit ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Standar Nitrit untuk Penghitungan Nilai ANR dengan Spektrometer Vis/UV Genesis10UV.

Beberapa tumbuhan memiliki kemampuan untuk mengubah senyawa nitrogen anorganik menjadi asam-asam amino yang merupakan kerangka dasar protein. Pada umumnya spesies tanaman menyerap nitrogen dalam bentuk NO_3^- , oleh karena itu NH_4^+ segera dioksidasi menjadi NO_3^- dengan bantuan bakteri nitrifikasi (Koryati et al., 2021). Enzim nitrat reduktase merupakan enzim yang berperan dalam sintesis amonium dan asam amino. Enzim ini berkerja dengan cara mereduksi nitrat menjadi nitrit. Penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas nitrat reduktase terhadap tiga sampel daun yaitu daun tebu, padi, dan jagung. Dari hasil pengukuran aktivitas nitrat reduktase masing-masing sampel tanaman menunjukkan nilai yang berbeda tergantung lama inkubasi. Lama inkubasi yang digunakan dalam penelitian adalah 60 menit, menunjukkan bahwa nilai unit ANR yang tertinggi terdapat pada daun tanaman padi dengan lama inkubasi 60 menit yaitu sebesar $0.150346 \mu\text{mol NO}_2 / \text{gram berat daun/ jam inkubasi}$. Sedangkan nilai total ANR yang terendah adalah pada sampel daun jagung yaitu sebesar $0.009891 \mu\text{mol NO}_2 / \text{gram berat daun/ jam inkubasi}$.

Perbedaan produktivitas yang dihasilkan dari ketiga sampel tanaman dapat dilihat dari nilai ANR yang diperoleh. Hal ini sesuai dengan penelitian Sadikin (2019) yang menyatakan bahwa hubungan antara laju reaksi dengan aktivitas enzim adalah berbanding lurus. Makin besar aktivitas enzim, makin cepat laju reaksi. Makin cepat laju reaksi, makin banyak pula produk yang terbentuk. Adanya hubungan yang berbanding lurus tersebut dapat mendukung tanaman untuk meningkatkan produktivitasnya.

Sehingga, apabila terjadi kenaikan pada aktivitas nitrat reduktase, maka produk yang dihasilkan juga akan naik seiring dengan kenaikan laju reaksinya. Rata-rata nilai ANR pada ketiga sampel daun tanaman yang diinkubasi dengan waktu yang sama yaitu selama 60 menit memperlihatkan nilai ANR yang rendah. Hal ini sesuai dengan penelitian Rockel et al., (2002) yang menyatakan bahwa aktivitas nitrat reduktase dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti laju sintesis dan laju perombakan enzim oleh penghancur protein (proteinase). Aktivitas nitrat reduktase akan terdegradasi pada reaksi gelap dengan penurunan aktivitas. Setelah fase ini berakhir, proteolisis muncul dan enzim proteinase akan mendegradasi aktivitas nitrat reduktase. Sedangkan menurut Peni & Solichatun (2004), aktivitas nitrat reduktase dipengaruhi oleh banyak faktor yaitu banyaknya cahaya yang diserap oleh daun, pH tanah, temperatur, kelembaban, umur tanaman, jenis penghambat (seperti tanin dan fenol), dan banyaknya substrat. Reduksi nitrat pada daun hijau dapat dipercepat dalam keadaan terang, sehingga baik nitrat maupun CO₂ dapat direduksi dalam reaksi gelap fotosintesis. Sampel dimasukkan ke dalam tabung gelap dengan tujuan agar nitrat direduksi oleh reaksi gelap dengan bantuan enzim nitrat reduktase hingga sampai nitrit saja. Tetapi bila terkena sinar matahari, maka nitrat akan tereduksi sampai amonia. Sebagian besar spesies tumbuhan tinggi mampu mereduksi nitrat sampai ke tahap amonia.

Penelitian ini juga menggunakan substrat enzim NaNO₃ dengan konsentrasi 5M dan tidak dilakukan variasi terhadap konsentrasi substrat. Variasi substrat dapat dilakukan untuk mengetahui sifat enzim nitrat reduktase yang bersifat inducibel artinya aktivitasnya meningkat dengan penambahan substrat (Rockel et al., 2002; Brahmanta, 2021). Penggunaan reagen pewarna seperti larutan NED berfungsi untuk memunculkan warna larutan yang menggambarkan banyaknya kandungan nitrit didalamnya. Semakin gelap warna larutan sampel, maka semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan, yang menunjukkan banyaknya kandungan nitrit didalam sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada daun tanaman tebu memperlihatkan warna ungu hal ini selaras dengan nilai absorbansi yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan jagung dan padi.

SIMPULAN

Hasil pengukuran ANR pada jagung, padi dan tebu menunjukkan bahwa nilai ANR tertinggi ditemukan pada sampel daun padi yaitu 0.1503 $\mu\text{mol}/\text{gram}$ berat daun/jam inkubasi. ANR yang tinggi menunjukkan bahwa semakin meningkat pula tenaga untuk

reduksi nitrat serta memberi kapasitas yang besar untuk sintesis asam amino, protein, atau asimilasi N total yang diketahui sangat penting untuk pertumbuhan vegetatif dan generatif pada tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari, K., Bhandari, S., Aryal, K., Mahato, M., & Shrestha, J. (2021). Effect of different levels of nitrogen on growth and yield of hybrid maize (*Zea mays* L.) varieties. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 4(2), 48-62.
- Brahmanta, A. (2021). *Potensi Terapi Hiperbarik Oksigen Dalam Ortodonti: Percepatan Pergerakan Gigi*. Airlangga University Press.
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2017). Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science*, 22(2), 163-174.
- Ende, S., Salawati, S., Kadekoh, I., Fathurrahman, F., Darman, S., & Lukman, L. (2022). Aktivitas Nitrat Reduktase (ANR) Tanaman Jagung pada Pola Tumpangsari yang Diberi Serasah Jagung-Kedelai serta Biochar di Lahan Suboptimal Sidondo Sulawesi Tengah. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 27(4), 528-535.
- Fu, Y. F., Zhang, Z. W., & Yuan, S. (2018). Putative connections between nitrate reductase S-nitrosylation and NO synthesis under pathogen attacks and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 474.
- Koryati, T., Purba, D. W., Surjaningsih, D. R., Herawati, J., Sagala, D., Purba, S. R., ... & Aldya, R. F. (2021). *Fisiologi tumbuhan*. Yayasan Kita Menulis.
- Mastur, M., Syafaruddin, S., & Syakir, M. (2015). Peran dan pengelolaan hara nitrogen pada tanaman tebu untuk peningkatan produktivitas tebu. *Perspektif: Review Penelitian Tanaman Industri*, 14(2), 73-86.
- Murtianingsih, H., & Hazmi, M. (2017). Isolasi dan uji aktivitas enzim selulase pada bakteri selulolitik asal tanah sampah. *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*, 15(2). Kolbert, Z., Bartha, B., and Erdei, L. (2008). Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J. Plant Physiol.* 165, 967-975. doi: 10.1016/j.jplph.2007.07.019.
- Peni, D. K., & Solichatun, A. E. (2004). Pertumbuhan, Kadar Klorofil-Karotenoid, Saponin, Aktivitas Nitrat reduktase Anting-anting (*Acalypha indica* L.) pada Konsentrasi Asam Giberelat (GA3) yang Berbeda. *Biofarmasi*, 2(1), 1-8.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., & Kaiser, W. M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of experimental botany*, 53(366), 103-110.
- Sadikin, M. (2019). *Biokimia Enzim*. Pustaka Poltekkes Padang. Padang.
- Sari, R., & Prayudyaningsih, R. (2015). *Rhizobium: pemanfaatannya sebagai bakteri penambat nitrogen*. *Buletin Eboni*, 12(1), 51-64.
- Simpson, M. G. (2019). *Plant systematics*. Academic press.
- Urban, A., Rogowski, P., Wasilewska-Dębowska, W., & Romanowska, E. (2021). Understanding maize response to nitrogen limitation in different light conditions for the improvement of photosynthesis. *Plants*, 10(9), 1932.
- Xu, Z., Chen, Y., Gartia, M. R., Jiang, J., & Liu, G. L. (2011). Surface plasmon enhanced broadband spectrophotometry on black silver substrates. *Applied Physics Letters*, 98(24), 241904.
- Zhang, X. C., & Shangguan, Z. P. (2007). Nitrogen Regulatory Metabolism in leaf membrane superoxidation on winter wheat with different drought resistant abilities. *Plant Nutrition. Fertility Science*, 13(1), 106-112.