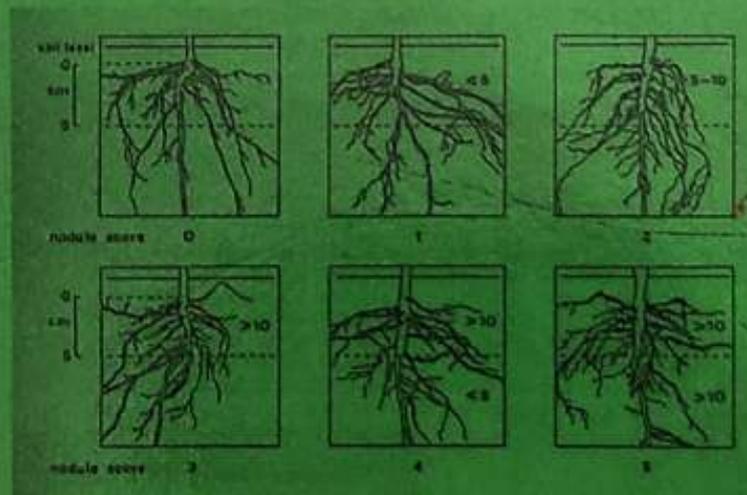


Methods for Evaluating Nitrogen Fixation by Nodulated Legumes in the Field

Editors

M.B. Peoples, A.W. Faizah, B. Rerkasem D.F. Herridge



Diterjemahkan oleh :

Didik Wisnu Widjajanto

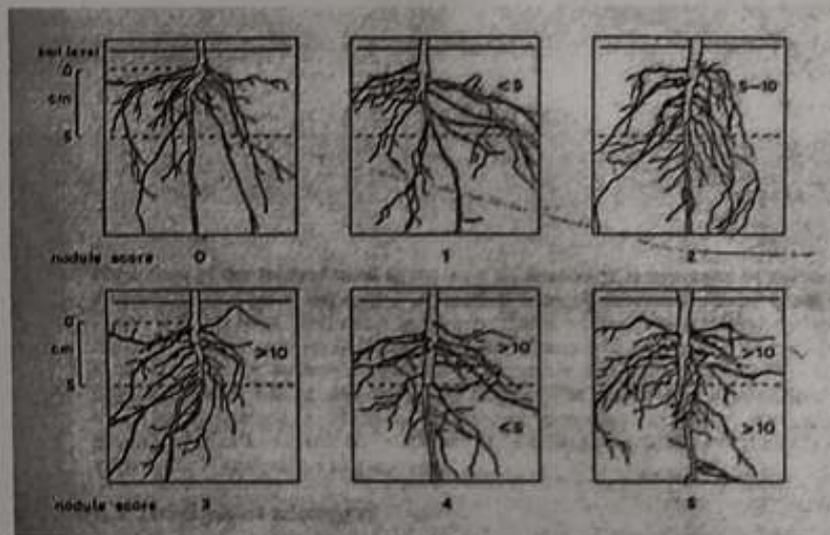


Badan Penerbit Universitas Diponegoro 2009

Methods for Evaluating Nitrogen Fixation by Nodulated Legumes in the Field

Editors

M.B. Peoples, A.W. Faizah, B. Rerkasem D.F. Herridge



Diterjemahkan oleh :

Didik Wisnu Widjajanto



Badan Penerbit Universitas Diponegoro 2009

**Berbagai Metoda
Evaluasi Fiksasi Nitrogen oleh
Leguminosa Berbintil Akar di Lapang**

Diterbitkan pertama kali oleh Badan Penerbit
Universitas Diponegoro Semarang

ISBN : 978-979-704-745-0

Hak cipta dilindungi Undang-undang

*Dilarang memperbanyak, mencetak dan menerbitkan
sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan dalam
bentuk apapun tanpa seijin penerbit*

Berbagai Metoda Evaluasi Fiksasi Nitrogen oleh Leguminosa Berbintil Akar di Lapang

Diterjemahkan oleh :

Didik Wisnu Widjajanto

Laboratorium Ilmu Tanaman Makanan Ternak
Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak
Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro

UCAPAN TERIMAKASIH

Mengucapkan terimakasih kepada Kepala Laboratorium Ilmu Tanaman Makanan Ternak dan Ketua Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro Semarang atas segala dukungannya didalam menyelesaikan terjemahan ini.

Pusat Penelitian Pertanian Internasional Australia (ACIAR) didirikan pada bulan Juni 1982 berdasarkan Keputusan Parlemen Australia. Tugasnya adalah untuk menolong identifikasi masalah-masalah pertanian di negara-negara sedang berkembang dan untuk membentuk komisi kerjasama penelitian antara Australia dan peneliti-penelitian negara sedang berkembang di lapang di mana Australia memiliki kemampuan khusus.

Dimana nama dagangan digunakan disini baik pengesahan maupun diskriminasi melawan setiap hasil dari pusat.

RANGKAIAN RISALAH ACIAR

Rangkaian ini dibahas secara tajam mengandung hasil-hasil penelitian asli yang didukung oleh ACIAR, atau dianggap relevan terhadap tujuan-tujuan penelitian ACIAR. Seri didistribusikan secara internasional, dengan penekanan pada negara dunia ke tiga.

@ Pusat Penelitian Pertanian Internasional Australia

G.P.O Box 1571, Canberra, A.C.T. 2601

M.B. Peoples, A.W. Faizah, B. Rerkasem, and Herridge, D.F., 1989. Metoda Untuk Evaluasi Fiksasi Nitrogen oleh Leguminosa Berbintil Akar di Lapangan. Risalah ACIAR No. 11, vii + 76p.

Penyusun dan perencana oleh Kantor Informasi Arawang Pty Ltd, Canberra. Dicitak oleh James Ferguson Pty Ltd, Halminton, Qld.

Kontributor Utama :

- F.J. Bergersen
Division of Plant Industry, CSIRO
G.P.O. Box 1600, Canberra, A.C.T. 2601
Australia
- K. Chong
Rubber Research Institute of Malaysia,
P.O. Box 10510,
50908 Kuala Lumpur
Malaysia
- A.W. Faizah
Rubber Research Institute of Malaysia,
P.O. Box 10510,
50908 Kuala Lumpur
Malaysia
- D.F. Herridge
NSW Agriculture & Fisheries
R.M.B. 944, Tamworth,
New South Wales 2340,
Australia
- M. Norhayati
Rubber Research Institute of Malaysia,
P.O. Box 10510,
50908 Kuala Lumpur
Malaysia
- M.B. Peoples
Division of Plant Industry, CSIRO
G.P.O. Box 1600, Canberra, A.C.T. 2601
Australia
- B. Rerkasem
Multiple Cropping Centre, Faculty of
Agriculture, Chiang May University,
Chiang May 50002,
Thailand
- M.N. Sudin
Rubber Research Institute of Malaysia,
P.O. Box 10510,
50908 Kuala Lumpur
Malaysia
- G.L. Turner
Division of Plant Industry, CSIRO
G.P.O. Box 1600, Canberra, A.C.T. 2601
Australia

PRAKATA

Defisiensi nitrogen merupakan permasalahan yang meluas/ besar pada banyak tanah yang digunakan untuk produksi tanaman pokok biji-bijian (cereal). Pada daerah berpotensi tinggi di dunia yang sedang berkembang, petani dapat meningkatkan penggunaan pupuk nitrogen untuk meningkatkan produksi cereal. Pada daerah yang kurang sesuai, sebuah alternatif sumber nitrogen yang murah pada sistem pertanian adalah fiksasi nitrogen oleh bakteri bintil akar pada leguminosa pangan dan pakan. Disamping berhemat terhadap ketersediaan nitrogen tanah, fiksasi nitrogen oleh leguminosa dapat menyediakan masukan pada pool organik tanah dan dilepaskan untuk tanaman-tanaman disekitarnya dan cereal berikutnya.

Meskipun banyak aspek fiksasi nitrogen secara biologi telah diteliti selama bertahun-tahun, perkembangan dari metoda yang telah diperbaiki untuk meningkatkan dan mengelola proses fiksasi nitrogen telah dihambat oleh ketidakcukupan atau oleh metoda-metoda yang sophistication untuk mengkalkulasi fiksasi nitrogen. Dalam rangka mengatasi hambatan-hambatan ini, ACIAR telah mensponsori atau mendanai penelitian yang bertujuan untuk mengembangkan mengembangkan metoda penghitungan fiksasi nitrogen menjadi lebih sederhana, dan lebih dapat diandalkan. Penelitian telah melibatkan kerjasama antara para ilmuwan di Universitas Chiang Mai Thailand, Institute penelitian karet Malaysia, dan CSIRO divisi industri tanaman dan NSW pertanian dan perikanan di Australia.

Buku pegangan ini menjelaskan metoda-metoda terutama dibuat untuk digunakan oleh ilmuwan di negara sedang berkembang. Panitia dipercaya untuk menampilkan metoda yang sederhana dengan prosedur yang lengkap. Terimakasih juga disampaikan pada program komunikasi ACIAR, terutama tuan Reg Macintyre yang telah mengedit publikasi, dan kepada kawan sejawat yang telah menyarankan sejumlah perubahan-perubahan yang membangun dan bermanfaat. Kami berharap bahwa para ilmuwan negara sedang berkembang menggunakan teknik-teknik yang dijelaskan disini akan mendapatkan pengertian yang lebih baik tentang peran fiksasi nitrogen pada sistem pertanian. Kami juga mengharapkan bahwa mereka menggunakan pengetahuan ini untuk mengkonstruksi sistem pertanian berdasar leguminosa lebih baik dan lebih produktif untuk petani-petani miskin yang menjadi langganan terakhir untuk mendukung penelitian ACIAR.

E.T. Craswell
Koordinator Program Penelitian
ACIAR

DAFTAR ISI

Prakata

1	Pendahuluan	1
1.1	Mengapa menghitung fiksasi N ₂	1
1.2	Metoda-metoda untuk menghitung fiksasi N ₂	2
2	Formasi Simbiosis Leguminosa-Rhizobium	4
2.1	Inokulasi	4
2.2	Evaluasi nodulasi	7
3	Analisis Nitrogen	9
3.1	Total nitrogen tanaman	9
3.2	Total nitrogen tanah	23
3.3	Mineral nitrogen yang dapat diekstrak	24
4	Teknik Xylem-Solute	27
4.1	Prinsip yang melatarbelakangi metoda	27
4.2	Pengambilan sampel N-solutes	32
4.3	Analisis	39
4.4	Kurva kalibrasi	47
4.5	Evaluasi analitik data dan estimasi fiksasi N ₂	53
4.6	Keuntungan dan kemungkinan penerapan metoda N-solutes	58
4.7	Keterbatasan potensi	58

5	Teknik Perbedaan-Nitrogen	61
5.1	Prinsip yang melatarbelakangi metoda	61
5.2	Penerapan, keuntungan dan keterbatasan	61
5.3	Metodologi	62
6	Teknik Isotop ^{15}N	65
6.1	Prinsip yang melatarbelakangi metoda	65
6.2	Penerapan, keuntungan dan keterbatasan	66
6.3	Metodologi	73
7	Kesimpulan	79
8	Daftar Pustaka	92
9	Ucapan Terimakasih	99
10	Lampiran	100

PENDAHULUAN

1.1. Mengapa Menghitung Fiksasi Nitrogen ?

Keuntungan khas tanaman leguminosa dalam sistem pertanian mencerminkan kapasitas potensi leguminosa dalam menfiksasi sejumlah besar nitrogen udara. Namun formasi simbiosis antara leguminosa dan *Rhizobium spp.* tergantung dari banyak faktor dan untuk terjadi tidak dapat diasumsikan sebagai suatu peristiwa biasa. Kegagalan untuk mencapai simbiosis yang efektif pada tanah dengan kandungan nitrogen mineral (N) rendah akan menghasilkan penurunan produksi leguminosa, aplikasi pupuk nitrogen sampai 60 kg N ha⁻¹ kemungkinan diperlukan untuk mencapai hasil benih setara dengan tanaman yang berbintil akar baik (Gault *dkk.*, 1984). Pada tanah dengan kandungan N tanah tinggi, leguminosa kemungkinan mengganti rendahnya fiksasi nitrogen dengan menggunakan nitrogen tanah. Meskipun produksi kemungkinan tidak terganggu pada situasi demikian hasil bersih leguminosa yang kekurangan bintil akar adalah pengurangan persediaan nitrogen. Kesuburan nitrogen tanah hilang dan ini menunjukkan pemborosan penggunaan leguminosa pada rangkaian sistem pertanian (Tabel 1.1.).

Tabel 1.1. Interaksi antara N Mineral Tanah, Fiksasi Nitrogen dan Produksi Leguminosa

N Mineral Tanah	Fiksasi Nitrogen	Produksi Leguminosa	Keuntungan Potensial untuk Tanah
Rendah	Jelek Baik	Rendah Tinggi	Tidak ada Tinggi
Tinggi	Jelek Baik	Tinggi Tinggi	Tidak ada Tinggi

Hubungan antara fiksasi N₂ dan tanaman atau produksi pangan adalah langsung dan jelas pada beberapa hal (seperti pada tanah dengan N mineral rendah, Tabel 1.1.), bagaimanapun keuntungan menyeluruh termasuk fiksasi N₂ oleh leguminosa pada sistem pertanian tidak dapat ditaksir kecuali dibuat suatu ukuran lapang dari level fiksasi yang tercepat, tepat dan dapat

diandalkan. Pada materi lain (seperti jumlah bintil akar, biomas leguminosa) hanya memberikan penaksiran kualitatif dan diskriptif.

Di bawah adalah daftar beberapa alasan mengapa pengukuran fiksasi nitrogen adalah penting pada beberapa aspek penelitian leguminosa.

(i) Pertimbangan ekologi mewajibkan pengetahuan tentang kontribusi relatif dari komponen-komponen fiksasi nitrogen ke siklus nitrogen.

(ii) Perkembangan sistem pertanian yang lestari. Pengetahuan tentang jumlah fiksasi N_2 oleh leguminosa yang dipengaruhi oleh pengelolaan tanah atau praktek-praktek kultural memberikan perkembangan efisiensi sistem pertanian dan produksi kehutanan.

(iii) Penghitungan fiksasi N_2 memungkinkan peneliti mengevaluasi kemampuan *Rhizobium spp.*, alam untuk mengefektifkan nodulasi leguminosa yang baru diperkenalkan, keefektifan simbiosis inokulan rhizobia dan keberhasilan prosedur inokulasi, atau kemampuan menfiksasi N_2 dari genotipe leguminosa pada program pemuliaan tanaman.

(iv) Sekali pemakai dipuaskan bahwa perkembangan bintil akar memadai, perhitungan fiksasi N_2 menetapkan apakah leguminosa mencapai potensinya, sehingga menjadi tambahan pembatas identifikasi, seperti keterbatasan nutrisi.

(v) Pengaruh residu terhadap tanaman berikutnya setelah pertumbuhan leguminosa sering dihubungkan dengan fiksasi N_2 . Kemungkinan ada keuntungan lainnya seperti perbaikan struktur tanah atau kontrol hama/penyakit.

1.2. Metoda untuk Menghitung Fiksasi N_2

Tidak ada satu cara yang "benar" untuk menghitung fiksasi nitrogen. Tidak ada satu teknik yang menyediakan perhitungan fiksasi N_2 yang akurat pada semua leguminosa yang tumbuh pada tanah dengan berbagai kondisi lingkungan. Setiap teknik memiliki keuntungan dan keterbatasan yang khas, dan ini akan dijelaskan secara terperinci pada bagian selanjutnya untuk semua metodologi yang sering digunakan kecuali Rangkaian Reduksi Acetylene.

Rangkaian Reduksi Acetylene adalah sebuah alat pendiagnosa yang berguna untuk mendeteksi aktivitas nitrogenase dan telah luas digunakan pada semua area penelitian fiksasi nitrogen karena kepekaannya yang tinggi dan kesederhanaannya. Walaupun, ketahanannya dipertanyakan pada setiap studi komparatif dengan leguminosa.

Rangkaian Reduksi Acetylene hanya memberikan perhitungan langsung dari aktivitas nitrogenase dibawah kondisi rangkaian yang berlaku, oleh karena itu ketelitiannya selalu dibatasi oleh persyaratan seberapa banyak ulangan determinasi untuk mengatur perubahan harian atau musiman secara jelas pada aktivitas fiksasi N_2 . Kesalahan lebih lanjut di lapangan dapat timbul dikarenakan penggunaan faktor kalibrasi yang tidak tepat untuk menghubungkan produksi etylene dengan fiksasi N_2 , tidak lengkapnya penemuan jumlah bintil akar tanaman, pelepasan bintil akar atau kerusakan sebelum analisis, gangguan tanaman, atau penurunan acetylene pada aktivitas nitrogenase selama reaksi (Witty dan Michin, 1988). Meskipun prosedur sistem aliran gas ditemukan untuk menguasai beberapa permasalahan teknik, prosedur aplikasi terbatas hanya untuk perhitungan fiksasi N_2 di lapangan.

Publikasi ini diharapkan akan melengkapi beberapa buku dan beberapa tinjauan artikel yang berhubungan dengan berbagai teknologi yang berasosiasi dengan simbiosis fiksasi N_2 . Terutama prinsip-prinsip dasar dari teknik *xilem-solute*, prosedur *N difference* dan metoda dilusi isotop ^{15}N untuk mengkuantifikasi fiksasi nitrogen akan dijelaskan. Aplikasi teknik-teknik ini di lapang akan didiskusikan sebagai data eksperimen yang akan dianalisis dan diinterpretasikan.

Pada setiap bagian pembaca akan disediakan berkenaan dengan sitasi kepustakaan yang sangat relevan. Untuk tambahan secara rinci sebagian besar isi akan berkenaan dengan leguminosa pangan, meskipun konsep umum dapat juga diaplikasikan terhadap sistem leguminosa yang lain. Metodologi serupa (*N-difference* ^{15}N) juga dipergunakan untuk mempelajari fiksasi nitrogen yang berasosiasi dengan non-leguminosa; pembaca akan dihubungkan dengan telaah yang luas tentang topik ini oleh Boddy (1987).

2

FORMASI SIMBIOSIS LEGUMINOSA - RHIZOBIUM

Kontribusi leguminosa pada setiap sistem produksi tergantung pada formasi bintil akar oleh strain *Rhizobium* efektif pada fiksasi N_2 dengan tanaman inang terpilih.

Terdapat tiga kelompok utama leguminosa yang dapat dibedakan pada kesesuaiannya dengan sejumlah strain *Rhizobium* (Tabel 2.1.). Satu kelompok ekstrim adalah kelompok leguminosa yang dapat membentuk simbiosis efektif dengan jangkauan yang lebih luas dari strain. Anggota kelompok ini adalah leguminosa tropika yang dinodulasi oleh *Rhizobium* dari *cowpea*. *Rhizobium spp.*, ini banyak tersebar di tanah-tanah tropika dimana leguminosa kelompok ini jarang menanggapi inokulasi, sehingga kegagalan nodulasi mungkin masih terjadi karena jumlah rhizobia yang rendah pada tanah dengan kandungan N mineral yang tinggi. Ekstrimis lainnya adalah leguminosa yang mensyaratkan rhizobia khusus. Kekhususan ini sangat relevan ketika leguminosa diperkenalkan pada areal baru. Tanggapan terhadap inokulasi dari leguminosa ini biasanya berhasil menjadikan jumlah rhizobia yang cukup diaplikasikan pada saat tanam. Kelompok ketiga dan pertengahan dari leguminosa berbintil akar dengan beberapa strain *Rhizobium*, tetapi keefektifan dalam fiksasi N_2 hanya sebatas jumlah dari mereka. Jadi kegagalan inokulasi dan nodulasi lebih sering karena strain inokulum tidak berkompetisi dengan yang tidak efektif, tetapi terhadap populasi rhizobia tanah yang telah establis.

Secara umum harus diingat juga bahwa kondisi lingkungan (suhu, ketersediaan air, pH tanah, dll.), derajat ketersediaan nutrisi mineral pada tanah (ditinjau oleh O'hara *dkk.*, 1988), dan penyakit leguminosa mungkin berpengaruh terhadap nodulasi dan atau fiksasi N_2 .

2.1. Inokulasi

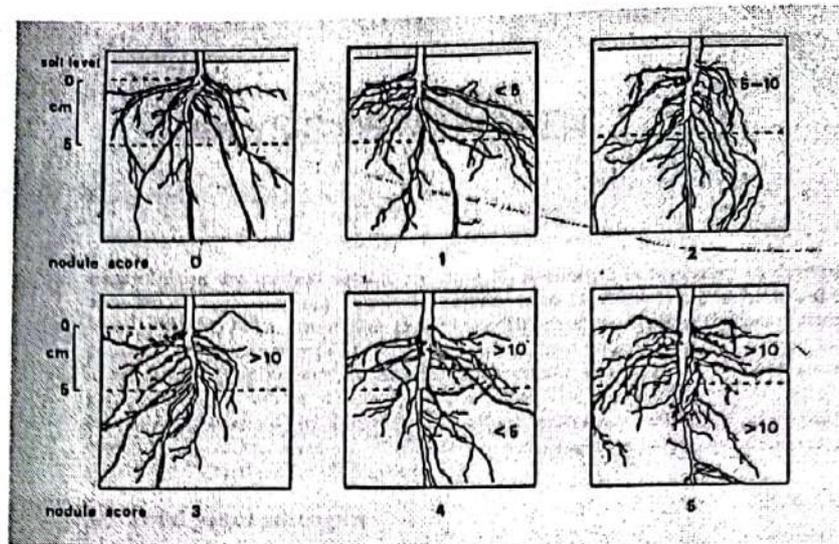
Terdapat lima kondisi dimana tanah mungkin menolak *Rhizobium* untuk membentuk simbiosis yang efektif dengan leguminosa, dan mungkin sebagai bukti inokulasi.

- (i) Tidak terdapatnya atau simbiosis dari leguminosa waktu sebelumnya
- (ii) Nodulasi yang jelek ketika sebelumnya ditanam dengan tanaman yang sama.
- (iii) Saat leguminosa mengikuti non-leguminosa pada sistem rotasi.
- (iv) Pada tanah yang direklamasi.
- (v) Ketika kondisi lingkungan tidak sesuai untuk kelangsungan hidup *Rhizobium* (seperti seandainya pH tanah <5,5 untuk *R. meliloti* atau >7,0 untuk *R. lupini*). Pada kondisi ini perbaikan tanah mungkin diwajibkan untuk menjamin ke establisian *Rhizobium*.

Tabel 2.1. Leguminosa, dikelompokkan berdasarkan nodulasi dan fiksasi nitrogen dengan sejumlah spesies *Rhizobium*^a

Nodulasi efektif dengan rentangan luas dari strain Daftar genera pembentuk satu kelompok bebas		
<i>Albizia</i>	<i>Galactia</i>	<i>Psophocarpus</i>
<i>Alysicarpus</i>	<i>Gliricidia</i>	<i>Pueraria</i>
<i>Arachis</i>	<i>Indigofera</i>	<i>Rhynchosia</i>
<i>Calliandra</i>	<i>Lablab</i>	<i>Stylosanthes</i>
<i>Calopogonium</i>	<i>Lespedeza</i>	(beberapa sub-kelompok)
<i>Cajanus</i>	<i>Macroptilium</i>	<i>Tephrosia</i>
<i>Canavalia</i>	<i>Macrotyloma</i>	<i>Teramnus</i>
<i>Clitoria</i>	<i>Mimosa</i>	<i>Vigna</i>
<i>Crotalaria</i>	<i>Pachyrhizus</i>	<i>Voandzeia</i>
<i>Dolichos</i>	<i>Pongamia</i>	<i>Zornia</i>
<i>Erythrina</i>	<i>Neonotonia</i>	
Nodulasi dengan rentangan strain tetapi sering tidak efektif Tabel genera pembentuk kelompok individu dengan beberapa silang antar kelompok. Sub-kelompok bisa dibedakan		
<i>Acacia</i>	<i>Astragalus</i>	<i>Psoralea</i>
<i>Adesmia</i>	<i>Centrosema (2 sub-group)</i>	<i>Sesbania (2 sub-group)</i>
<i>Aeschynomene</i>	<i>Desmanthus</i>	
	<i>Desmodium (2 sub-group)</i>	
Nodulasi efektif hanya dengan strain spesifik Tabel genera pembentuk kelompok spesifik		
<i>Cicer</i>	<i>Lotononis-Listia (3 sub-group)</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Coronilla</i>	<i>Lotus (3 sub-group)</i>	<i>Pisum</i>
<i>Glycine max</i>	<i>Lupinus (2 sub-group)</i>	<i>Trifolium (banyak sub-group)</i>
<i>Hedysarum</i>	<i>Medicago</i>	<i>Trigonella</i>
<i>Lathyrus</i>	<i>Melilotus</i>	<i>Vicia</i>
<i>Lens</i>	<i>Onobrychis</i>	
<i>Leucaena</i>	<i>Ornithopus</i>	

^a J. Brockwell, komunikasi pribadi



Gambar 2.1. Penjelasan diagramatik kriteria klasifikasi secara visual yang digunakan untuk mengevaluasi sistem akar kedelai. Skor bintil akar diduga dengan jumlah bintil akar efektif pada area akar puncak (daerah 5cm di bawah akar lateral pertama) dan ditempat lain pada sistem akar setelah J. Brockwell dan R.R. Gault (komunikasi pribadi) adaptasi dari skema yang dirancang oleh Corbin *dkk.* (1977) untuk kacang panjang.

Efektivitas bintil akar umumnya dapat diukur dengan derajat pewarnaan merah muda atau merah dari jaringan bakteroid penfiksasi N_2 di dalam setiap bintil akar. Umumnya bintil akar putih atau hijau adalah tidak efektif dan tidak dipertimbangkan ketika penggolongan nodulasi aktif pada saat ini. Urutan digambarkan pada gambar 2.1. dan dijelaskan pada Corbin *dkk.*, (1977) dianggap hanya sebagai petunjuk; urutan tersebut seharusnya dipertimbangkan kembali untuk species lain pada lingkungan yang berbeda. Idealnya penilaian secara visual sebaiknya dilakukan secara konsisten oleh satu orang dalam keseluruhan penelitian, tetapi jika lebih dari satu orang terlibat divisi pelaku sebaiknya berdasarkan pada replikasi dan bukan perlakuan. Tatacara meliputi penggalian 20 tanaman secara acak melintasi tanaman secara hati-hati (menjamin sistem akar dan bintil akar ditemukan kembali) dan penilaian setiap tanaman menggunakan penentuan awal kriteria penggolongan. Skor dari semua tanaman ditambah dan dibagi dengan 20 untuk mendapatkan rata-rata skor bintil akar. Rata-rata skor bintil akar :

- 4-5 : nodulasi sangat baik; potensi fiksasi N_2 sangat baik
- 3-4 : nodulasi baik; potensi fiksasi N_2 baik
- 2-3 : nodulasi cukup; fiksasi N_2 mungkin tidak cukup untuk mensuplai kebutuhan N tanaman
- 0-2 : nodulasi jelek; kecil atau tidak ada fiksasi N_2

3

ANALISIS NITROGEN

Tanpa memperhatikan pada metoda yang dipergunakan untuk menghitung fiksasi N_2 , adalah perlu untuk menentukan jumlah keseluruhan tanaman dan N tanaman jika input N oleh fiksasi N_2 dikuantifikasi dalam $kg\ N\ ha^{-1}$. Evaluasi dan interpretasi data fiksasi N_2 dapat juga dibantu dengan penghitungan ketersediaan nitrogen tanah. Prosedur yang telah ditemukan dan menjadi sangat terkenal di laboratorium untuk akurasi dan pengulangan pengukuran tanaman dan N tanah akan dirinci pada bab ini. Penjelasan tentang metoda analisis telah diadaptasi termasuk tindakan pencegahan perlu untuk pengukuran level ^{15}N yang rendah secara tepat (Tabel 6.1.) lihat Bergersen (1988), dan metoda-metoda tersebut juga sesuai untuk semua tujuan analisis N.

3.1. Nitrogen Total Tanaman

Terdapat dua metoda yang biasa digunakan untuk analisis. Pertama adalah metoda oksidatif, berdasar pada teknik *Dumas*, dimana dengan adanya CuO bahan organik dioksidasi untuk memproduksi gas N_2 , dalam hal ini isi yang diukur. Pembukaan yang tidak tuntas dapat menjadi sebuah masalah pada metoda ini (hanya 70-80% dari sampel diubah menjadi N_2 tanpa percampuran selama pembakaran, 90% dengan pembakaran dan sampai 99% konversi dengan penambahan *kalium perchlorate*; Fielder 1984) dan kemungkinan tidak sesuai untuk determinasi yang sangat tepat pada level ^{15}N yang rendah; terutama jika terdapat variasi pada kandungan ^{15}N atau kandungan N bahan kering diantara jaringan tanaman yang berbeda dan adanya kurang perhatian dalam pengambilan sampel (seksi 3.1.2.2.). Biasanya digesti basah *Kjeldahl* digunakan. Dalam hal ini, organik dan N mineral direduksi menjadi NH_3 pada kondisi panas, sebagai katalisator adalah H_2SO_4 . NH_3 ditemukan kembali dengan destilasi atau difusi dan estimasi dengan titrasi atau Colorimetri (Bergersen, 1980).

3.1.1. Pengambilan Sampel

Kesulitan untuk mendapatkan estimasi yang akurat dari bahan kering dan kandungan N tanaman umumnya merupakan simpulan dari kesalahan pengambilan sampel daripada kesalahan-kesalahan yang berhubungan

Rhizobia yang akan digunakan untuk inokulasi mungkin diisolasi oleh peneliti sendiri dari bintil akar, materi akar kering, atau tanah atau didapatkan dari koleksi kultur *Rhizobium* (lihat lampiran 10.1; Brockwell, 1980; Somosegaran dan Hoben, 1985). Disisi lain lebih lanjut kultur disyaratkan tumbuh, dan multifikasi sehingga jumlah bakteri cukup untuk inokulasi (beberapa aspek dari produksi inokulan dan penggunaan inokulan ditinjau di Somosegaran dan Hoben, 1985; Thompson, 1980 dan Vincent, 1982). Secara alternatif, inokulan dapat diperoleh dari produser komersial. Dalam hal ini perlu dipertimbangkan kemungkinan untuk menseleksi inokulan komersial dengan kualitas tinggi. Jumlah minimum bakteri efektif yang diterima dalam kultur *peat* oleh *Australian inoculants Research and Control Service* (Gosford, NSW) adalah 10^9 rhizobia g^{-1} di pabrik dan 10^8 pada saat inokulan kedaluwarsa dengan kurang dari 0,1% kontaminasi (produser inokulan Australia yang membuat standar ini didaftar pada apendik 10.2). Tidak semua pabrik secara rutin memproduksi inokulan untuk semua leguminosa, tetapi ada kemungkinan untuk mengatur sejumlah rhizobia khusus untuk difermentasikan untuk species leguminosa yang tidak umum.

Metoda inokulasi benih leguminosa sangat banyak dan sering ditentukan oleh tujuan dari eksperimen (lihat diskusi pada Brockwell (1980), Gault *dkk.* (1982) dan Vincent (1982). Beberapa prinsip umum diaplikasikan apapun teknik yang dipilih :

- (i) Jika perlakuan kontrol tidak diinokulasi, termasuk perlakuan-perlakuan tersebut harus selalu dirawat sebelum perlakuan dimana benih diinokulasi.
- (ii) Pada tujuan penelitian level inokulasi seharusnya selalu setinggi mungkin. Keberadaan jumlah yang besar dari inokulan rhizobia mengurangi area kontaminasi dan nodulasi dengan keberadaan rhizobia atau strain dari perlakuan inokulasi lainnya.
- (iii) Rhizobia merupakan organisme yang aktif dan mudah dipindahkan oleh pergerakan air, manusia, atau hewan, atau kebetulan dari perlakuan ke perlakuan atau dari plot ke plot. Kesadaran terhadap hal tersebut dibutuhkan untuk menyusun eksperimen, melindungi ketidaksertaan hewan, penyiangan, dan bahkan berjalan melintasinya.
- (iv) Rhizobia tidak cocok dengan berbagai agrokemikalia yang diaplikasikan sebagai pembalutan benih. Meskipun pupuk seperti super fosfat kemungkinan beracun terhadap rhizobia apabila dicampur dengan kontak langsung dengan benih yang telah diinokulasi, karena super fosfat adalah sangat asam.

(v) Rhizobia dengan mudah dapat dibunuh dengan panas. Oleh karena itu inokulan harus disimpan pada kondisi dingin sebelum digunakan. Suhu lingkungan pada saat penanaman juga penting. Jumlah 4,6% inokulan kedelai ditemukan kembali dari tanah 24 jam setelah penanaman pada 28°C; tetapi hanya 0,2% atau kurang mungkin hidup pada suhu 38°C (Brockwell *dkk.*, 1987).

2.2. Evaluasi Nodulasi

Banyak ciri yang memberikan evaluasi secara subjektif dari tanggapan inokulasi atau kapasitas dari tanaman untuk menfiksasi nitrogen dapat ditaksir selama penelitian di lapang. Hal ini sangat berguna seandainya diambil bersamaan dengan perhitungan fiksasi N₂ di lapang dan sering dapat membantu interpretasi data yang dihasilkan. Seperti parameter-parameter meliputi ketepatan nodulasi, jumlah bintil akar, massa dan warna, distribusi dan keberadaan populasi bintil akar dan skor nodulasi secara visual.

Nodulasi umumnya diduga secara periodik setelah penanaman dengan menggali sejumlah tanaman secara acak dari setiap perlakuan. Jumlah dan massa bintil akar atau berat bintil akar per berat kering tanaman dan akar sering digunakan dalam percobaan perbandingan; bagaimanapun informasi yang mirip dapat dihasilkan dengan penskoran nodulasi secara visual dengan dasar 0-5 meliputi jumlah, ukuran, pigmentasi/warna dan distribusi bintil akar.

Sistem yang direncanakan untuk kedelai pada Gambar 2.1. menjelaskan adaptasi dari kriteria klasifikasi yang digunakan oleh Corbin *dkk.* (1977) saat penentuan nodulasi secara visual pada lahan yang ditanami *chickpea*. Skor bintil akar kedelai ditentukan oleh jumlah bintil akar efektif pada daerah puncak akar (daerah 5cm di bawah akar lateral pertama; ini mungkin sebesar 10cm di bawah permukaan tanah, tergantung dari kedalaman tanam) dan dilain tempat pada sistem akar (Gambar 2.1.).

dengan analisis berikutnya. Prinsip pengambilan sampel dan sub pengambilan sampel didiskusikan oleh Hunt *dkk.* (1987).

Sampel-sampel tanaman seharusnya dikoleksi dari lapang dengan menggunakan pola yang ditetapkan sebelumnya, yang sebaiknya diikuti semua plot atau pengambilan sampel area. Umumnya, lebih disukai mengambil sampel dari replikasi perlakuan dengan panjang yang tetap (misalnya 1m) atau area persegi (misalnya 300 x 300 mm). Kadang-kadang pengambilan sampel mungkin dilakukan pada tanaman secara individu, tetapi ini biasanya memberikan kekurangtelitian dan bila jumlah sampel sedikit dapat menimbulkan bias pada estimasi (lihat Hunt *dkk.*, 1987). Analisis akar juga sangat diperlukan. Namun demikian, pada kebanyakan tanah pengambilan akar mungkin sangat sulit sehingga analisis harus dibatasi pada bagian atas tanaman atau keseluruhan tanaman disertakan.

3.1.2. Persiapan Sampel untuk Analisis

3.1.2.1. Pengeringan

Sampel tanaman harus dikeringkan sampai beratnya konstan pada 75°C (biasanya selama 48 jam) dalam oven dengan sirkulasi udara. Sampel-sampel yang sangat menumpuk seharusnya diratakan pada penampakan logam dan dikembalikan ke tas pada saat kering. Berat kering dari total sampel segera dicatat.

3.1.2.2. Sub Pengambilan Sampel dan Persiapan Digesti

Ditimbang, sampel kering sebaiknya dipotong-potong atau digiling kasar. Sebuah alat yang sesuai adalah *Wiley Mill* No. 3, dipasang dengan sebuah layar 1mm dan gerobak untuk sampel makanan padat. Jumlah sampel yang digiling selanjutnya dicampur sampai merata pada selebar kertas atau plastik dan 5-10 g sub-sampel disimpan pada kontainer yang tertutup rapat. Kemudian semua sub-sampel digiling dengan menggunakan layar tipis di atas gilingan, atau lebih disukai digiling sampai menjadi bubuk lembut dengan menggunakan palu yang dipasangkan dengan layar 0,2 mm. Kemungkinan lain, menggunakan penggiling bulat di laboratorium (misalnya *Roklabs Pty Ltd.*, Auckland, NZ) untuk memproduksi sampel yang sangat halus. Sub-sampel giling yang sangat lunak dikembalikan ke kontainer dan disimpan kering sampai dilakukan analisis.

Alat penggiling seharusnya dibersihkan diantara sampel dengan menggunakan penyemprot udara atau disikat dengan hati-hati. Hal ini sangat penting saat analisis ^{15}N dilakukan. *Sampel untuk determinasi kandungan ^{15}N*

alam sebaiknya digiling dalam jumlah yang banyak pada waktu yang berlainan dari sampel yang diperkaya ^{15}N , dan penanganan dengan penuh perhatian sebaiknya dilakukan untuk menghindari kontaminasi antar sampel (lihat Bergersen, 1988).

Pada iklim basah atau lembab, sampel yang telah digiling lembut sebaiknya dikeringkan lagi sampai beratnya konstan dan dicampur merata sebelum analisis. Sekitar 300 mg sub-sampel yang telah tercampur baik dari material tanaman yang telah digiling lembut ditimbang sampai $\pm 0,001$ g dan dipindahkan ke bejana digesti (lihat Tabel 3.1. untuk ukuran sampel yang sesuai untuk jaringan yang berbeda).

Pada semua fase dalam persiapan sampel, harus diingat bahwa ketidaksamaan bentuk sub-sampel merupakan sumber utama dari kesalahan. Semua sampel sebaiknya dicampur merata sebelum sub-sampel diambil. Getaran selama penyimpanan mengakibatkan ketidaksamaan bentuk di dalam kontainer, meskipun isi telah tercampur dengan baik. Material halus dan kasar yang terpisah di dalam penyimpanan sering berbeda keduanya dalam konsentrasi N dan kandungan ^{15}N alami (G.L. Turner, data tidak dipublikasikan).

3.1.3. Digesti

3.1.3.1. Reagen

Asam sulfat pekat analitis	1 L
(dari botol yang dibuka dan diproteksi)	
K_2SO_4 (untuk meningkatkan titik didih)	100 g
Bubuk logam Selenium	1 g

Tempatkan zat padat dalam 5 atau 10 L tabung erlenmeyer. Selenium adalah gas beracun dan harus ditangani secara baik untuk menghindari asap ke pemapasan dan menggunakan penyelesaian praktis secara aman. Tambahkan asam perlahan-lahan hindarkan tetesan-tetesan. Prosedur normal dengan menggunakan kekuatan asam-asam umumnya cukup. Panaskan labu sampai 200°C pada pemanggang pasir yang besar, volume yang cembung disimpan semua untuk menahan asam jika botol pecah. Pada saat larut secara sempurna, larutan kekuning-kuningan. Matikan pemanas dan hentikan labu dengan penyumbat dari karet, di belakang lubang masuk udara isi dengan *glass bead* yang direndam dengan asam, untuk memproteksi isi labu dari konsentrasi dengan menggunakan NH_3 yang selalu terdapat di laboratorium dimana udara dialirkan ke dalam labu sehingga terjadi pemindahan reagen ke labu yang

ditutup secara kuat. (Catatan : perokok mengandung resiko, asap tembakau berisi NH_3 bebas dan materi N lainnya. Juga senyawa nitrogen yang mudah menguap seharusnya disimpan secara baik jauh dari reagen-reagen digesti). Reagen yang dijelaskan di atas telah ditemukan sebgas atau lebih baik dari publikasi lainnya tentang formulasi yang berisi katalisator lain seperti Hg dan Cu. Penemuan kembali secara lengkap dari senyawa N seperti *tryptophane* atau asam nikotin adalah biasa ketika digesti dilanjutkan selama 1 – 2 jam setelah pembersihan.

3.1.3.2. Peralatan

Meskipun digesti secara konvensional pada labu leher panjang masih digunakan, demikian juga digesti skala kecil dengan labu erlenmeyer 100 mL dengan kontrol suhu, *plate* panas secara elektrik (Bergersen, 1980), metoda selanjutnya lebih disukai saat analisis ^{15}N dilakukan.

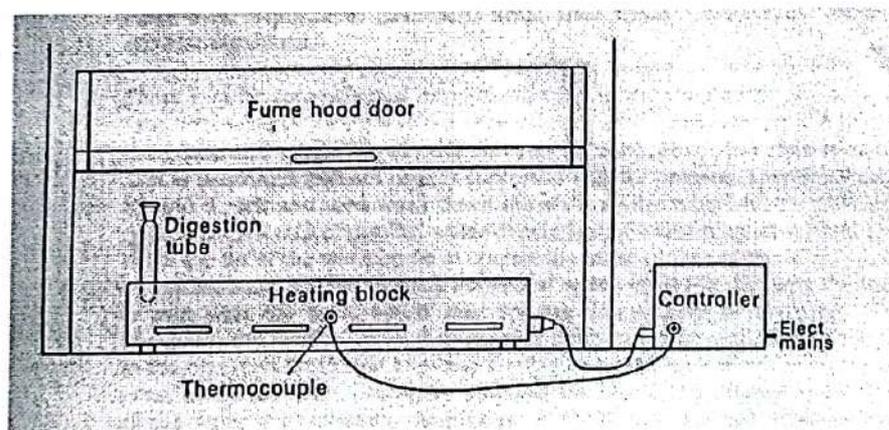
Bejana digesti untuk material tanaman adalah tube standar *Quickfit Pyrex* dengan standar penutup atas dan bawah meruncing (24/29 mm). Diameter dalam sekitar 25 mm, diameter luar sekitar 27 mm dan tinggi 170 mm. (Catatan : banyak pabrik mensuplai tube dengan dimensi berbeda; tube-tube dimensi berlubang sesuai untuk digesti blok) adalah sesuai untuk memindahkan sampel material tanaman halus (± 300 mg) pada sejumlah tube; tutup dan simpan tube-tube pada rak sebelum digesti dimulai.

Tube-tube dipanaskan pada blok logam, berlubang untuk menerima tube-tube digesti dengan jarak ruang saat dingin sekitar 1 mm, dan kedalaman total 30 mm. Blok logam mungkin dipanaskan secara langsung dari elemen pemanas yang sesuai pada unit-unit komersial (misal Gambar 3.1.), atau mungkin blok diletakan pada plat pemanas listrik. Jika tersedia fasilitas bengkel, blok digesti dapat dikonstruksi dari kuningan (lebih resisten terhadap asam daripada aluminium), atau dari besi tuang dan permukaan ditutup dengan material isolasi untuk mengecilkan pancaran pemanas dari bagian atas tube-tube digesti. Gambar dan diagram sirkuit dari pengontrol elektronik seperti unit ini dapat diperoleh dengan ijin dari penulis.

Digesti seharusnya dilakukan pada kap dengan ventilasi uap yang baik. Seperti terlihat di bawah, digesti yang dikerjakan secara baik menimbulkan sedikit uap asam sekali oksidasi selesai. Suhu blok digesti seharusnya diatur dengan muatan yang penuh saat kap beruap sedang dioperasikan dengan menurunkan level tutup tube (yaitu pendinginan maksimum, lihat Gambar 3.1.).

3.1.3.3. Prosedur

- (a) Nyalakan pemanas blok digesti dan usahakan sampai mencapai suhu digesti, seperti diindikasikan oleh termometer yang terletak pada tube yang tidak dipakai dekat pusat blok. Suhu tube biasanya sedikit lebih rendah dari suhu blok. Pengontrolan suhu digesti sangat penting. Bagaimanapun suhu seharusnya tidak lebih 320°C dan telah dibuktikan bahwa yang terbaik adalah antara 280-310°C. Suhu yang lebih tinggi mungkin menghasilkan digesti yang lebih cepat, tetapi ada N yang hilang karena adanya dekomposisi panas dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam asam, meskipun adanya perubahan yang terus menerus dari asam yang dikontrol secara baik di bawah tutup tube. Kehilangan seperti ini, meskipun jarang terdeteksi, memisahkan secara isotopik dan mempengaruhi peningkatan analisis ^{15}N pada digesti (yaitu hilangnya N turun pada ^{15}N ; Bergersen, 1988). Digesti 300-500 mg material tanaman biasanya memakan waktu sekitar 16 jam pada 300°C.



Gambar 3.1. Peralatan yang digunakan pada digesti material tanaman untuk dideterminasi nitrogen total dan ^{15}N . Penjelasannya lihat pada bacaan.

- (b) Ketika blok panas, pindahkan penyetop dari 4 tube dan tambahkan reagen digesti dengan isi yang sesuai (Tabel 3.1.) untuk ditimbang, masukan sampel halus ke dalam tube digesti, menggunakan pipet *bulb* atau unit gelas dispensi (seperti EMIL Presmatik Dispenser, MK2); *jangan memipet asam digesti dengan mulut*, atau biarkan menetes keluar dari tube.
- (c) Tempatkan tube-tube pada blok digesti panas dan lihat dengan penuh perhatian karena pada awalnya akan berbuih dan hangus. Kontrol hangus

dicapai paling baik dengan pemberian air destilasi dingin dari pipet gelas *pasteur* bersih yang dihubungkan dengan karet *bulb*. Seandainya terjadi tetesan ke dalam steker, dekat dengan dinding tube, steker patah atau jatuh dan seterusnya tidak meningkat. Seandainya ini tidak berhasil angkat tube dari blok sebelum separuh bagian atas terkontaminasi. Jika buih hancur, lanjutkan pemanasan. Pengulangan perlakuan air sekali atau dua kali diperlukan, hingga pembuihan awal berhenti. Kemudian diteruskan dengan 4 sampel (Catatan : pembuihan lebih besar jika tube ditempatkan pada blok sebelum pembuihan mencapai suhu operasi).

- (d) Apabila seluruh urutan dari sampel digesti lancar, periksa bahwa aliran kembali asam tidak lebih 70 mm di atas permukaan. Jika aliran kembali lebih tinggi, kurangi sedikit suhu digesti, atau lebih disukai tingkatkan aliran udara dengan mengatur pembukaan penutup uap dan atau mengatur kecepatan fan penutup uap untuk membuang asap; ini akan mengurangi suhu separuh bagian atas dari tube digesti. Sekali pengaturan dilakukan seharusnya dilakukan hal yang sama pada semua digesti berikutnya.

Mungkin beberapa material hangus menempel pada gelas di atas areal dari dinding tube yang sedang dicuci dengan aliran asam. Seandainya demikian pindahkan tube dari blok dan secara hati-hati aduk isi tube untuk mengeluarkan material hangus tersebut. Ini berbahaya dan biasanya tidak berhasil tanpa latihan. Oleh karena itu, dinginkan tube pada rak dan kemudian bersihkan dinding tube dengan air destilasi sebanyak 1-2 mL secara langsung pada permukaan yang terkontaminasi. Jangan sampai ujung dari botol yang dicuci bersentuhan dengan permukaan dalam tube (hindari kontaminasi).

Setelah penambahan sedikit air, aduk cairan digesti secara mantap untuk mencampur dengan asam, dimana mungkin terjadi getaran yang berbahaya jika air merembes secara langsung pada permukaan, meskipun turun ke bawah pada dinding tube. Kembalikan tube pada blok digesti dan lanjutkan pemanasan. Seandainya tambahan air terlalu banyak, hindari mendidih yang berlebihan dengan mengurangi suhu blok sampai 150°C sehingga seluruh air terevaporasi, kemudian kembalikan ke 310°C dan lanjutkan digesti selama 1-2 jam setelah digesti menjadi tanpa warna.

Untuk beberapa sampel tanaman dimana mengandung lebih banyak materi mineral (terutama Fe), digesti meninggalkan warna kuning kecoklatan meskipun digesti sudah selesai. Warna ini dengan mudah dibedakan dari warna coklat muda dikarenakan sisa dari material

organik yang tidak terdigesti dimana terlihat sebentar sebelum digesti selesai.

- (e) Ketika digesti selesai, pindahkan tube, hentikan dengan baik, keringkan penysetop dan dinginkan.
- (f) Penambahan air destilasi sebanyak 10 mL selanjutnya secara perlahan-lahan, dengan mengaduk untuk mencegah terlalu panas. Pemindahan larutan digesti secara kuantitatif ke labu volumetrik (Tabel 3.1.), menggunakan corong gelas kecil (dicuci bersih diantara sampel) dan beberapa volume kecil dari air destilasi tercuci turun disisi (dinding) tube dan diaduk untuk memindahkan setiap sisa asam dari tube ke dalam labu. Akhirnya cuci corong ke dalam labu volumetrik dan tambah air untuk menandai tutup labu volumetrik dan campur isi secara merata.

Tabel 3.1. Ukuran sampel tanaman, digesti, cairan, dan destilasi volume untuk ketentuan paling sedikit 4 kali ulangan destilasi berisi sekitar 1 mg nitrogen tanaman untuk analisis mass spectrometer (berdasarkan pada kedelai yang ditanam di lapang).

	%N	Sampel kering (mg)	Reagen digesti (mL)	Pengencer digesti ^a (mL)	Volume destilasi ^b (mL)	N dalam larutan destilasi (mL)
Benih (3,5-6) ^c	6	250	5	50	5	1,5
	5	250	5	50	5	1,25
	4	300	5	50	5	1,2
Daun (1,5-4,5)	3	300	5	50	5	0,9
Total shoot (1,5-3,5)	2	300	5	25	5	1,2
Total tanaman (1-3)	1	500	7	25	5	1,0
Akar (0,5-1,5)	0,5	1000	10	25	5	1,0

^a Volume larutan yang dipersiapkan dalam labu volumetrik

^b Akurasi volume pipet ($5 \pm 0,05$ mL)

^c Rentangan nilai %N dari setiap jaringan tanaman yang diharapkan

3.1.3.4. Pengaturan Nitrat

Tanaman biasanya mengandung nitrat. Jika jumlah nitrat kecil, biasanya terdapat karbon yang cukup mempengaruhi reduksi nitrat menjadi ammonia selama digesti. Bagaimanapun hal ini mungkin bervariasi dan jika terdapat alasan untuk menduga bahwa terdapat sejumlah nitrat maka disarankan untuk memodifikasi prosedur digesti. Terdapat beberapa metoda yang sesuai dan paling sederhana adalah mengubah nitrat menjadi asam nitrosalisiklik, yang siap untuk di digesti memproduksi ammonia.

Sampel yang telah ditimbang pada bejana digesti dan dicampur dengan 1-3 mL larutan asam salisiklik murni (5% W V⁻¹ dalam H₂SO₄ pekat) selama paling sedikit 20 menit sodiumthiosulfat (0,3-1 g) kemudian ditambahkan dan campuran mantap dipanaskan hingga menguap. Kemudian didinginkan, reagen digesti ditambahkan dan digesti dilaksanakan seperti dijelaskan sebelumnya.

3.1.4. Penemuan ammonia dengan destilasi dan estimasi dengan titrasi

3.1.4.1. Reagen

A. Asam borik/ indikator

(Reagen ini mengandung lebih sedikit asam borik seperti biasanya dijelaskan. Reagen dibuat untuk destilasi 1-5 mg NH₃-N saat analisis mass spectrometer dilakukan).

Asam borik (standar analitis)	10 g
Air destilasi	1 L
Indikator campuran (4 mL 0,1% methyl merah + 20 mL 0,1% Brom kresol hijau masing-masing dilarutkan dalam 95% ethanol)	10 mL

Ketika dilarutkan, atur larutan sampai netral dengan 1% NaOH (sampai indikator akhir berwarna merah keabu-abuan).

B. 10 M NaOH

NaOH (standar analitis)	400 g
Air destilasi	1 L

C. Phenolphthalin (1% W V⁻¹ dalam 50% ethanol).

D. Borak standar

Air 55°C dijenuhkan dengan borak (Na-borate-standar analitis), disaring dan dibiarkan supaya mengkristal. Kristal didapat kembali, dilarutkan kembali pada 55°C sampai jenuh dan dikristalkan lagi. Kristal didapat kembali, dan berturut-turut dicuci dengan air destilasi dingin, ethanol kering, dan diethyl eter kering, sebelum pengeringan pada kertas saring. Kristal pada akhirnya diseimbangkan diatas larutan air destilasi, dijenuhkan dengan NaCl dan sukrosa, tempatkan pada kontainer tertutup selama paling sedikit 24 jam. Kemudian simpan pada kondisi yang seharusnya sama.

E. HCl Standar

Kira-kira N/28 HCl : 31,8 mL HCl standar analitis dilarutkan dengan air destilasi dan disimpan dalam botol dan ditutup rapat. 1 mL N/28 HCl (0,03571N) setara terhadap 0,5 mg N. HCl standar ini sebaiknya distandarisasi sebagai berikut :

Larutkan kira-kira 0,3 g borak standar ($0,3 \pm 0,0005$ g) dalam 50 mL air destilasi dalam labu volumetrik. *An aliquot* dari 10 mL larutan ini dititrasi dengan asam menjadi standar menggunakan satu tetes 0,1% methyl ethanol merah sebagai indikator.

$$\text{Normalitas asam} = \frac{\text{Berat borak} \times 200}{190,72 \times \text{mL asam yang digunakan}}$$

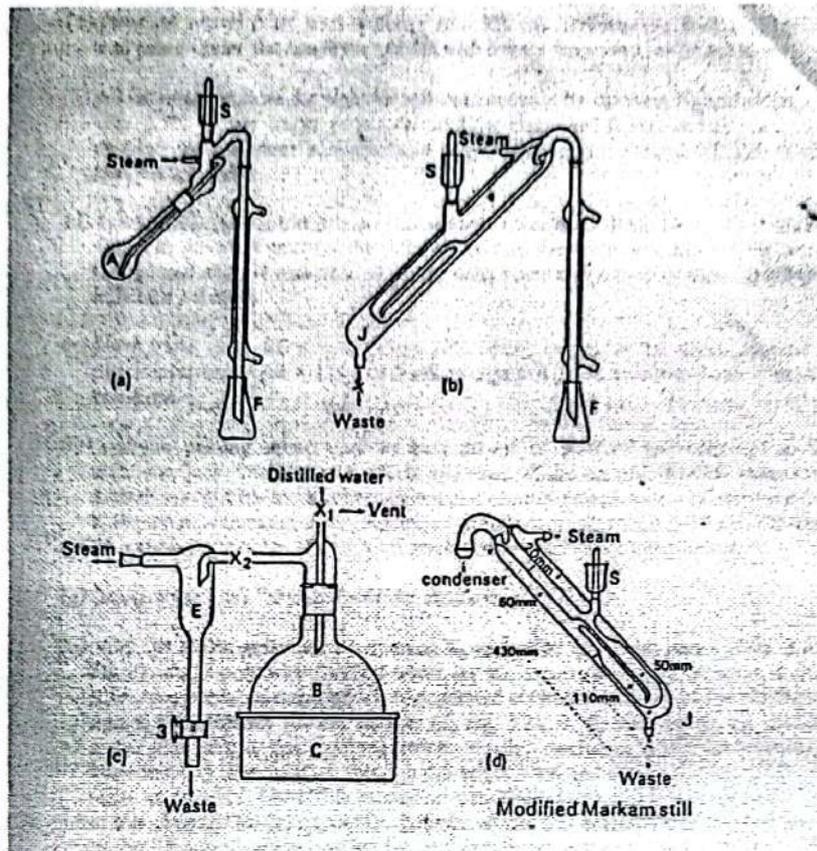
Sebagai alternatif larutan standar komersial HCl mungkin digunakan setelah larutan akurat memberikan normalitas yang diinginkan.

3.1.4.2. Peralatan

Beberapa peralatan komersial yang masih sesuai untuk menentukan NH_3 adalah digesti *Kjeldahl* (Gambar 3.2a dan b). NH_3 datang dari pendingin dalam aliran panas yang telah didinginkan ditangkap oleh larutan indikator asam borik. Adaptasi dari design komersial telah membuktikan lebih unggul saat dilakukan analisis ^{15}N , ditunjukkan pada Gambar 3.2d. Peningkatan volume kamar sampel mengurangi bahaya dari kabut basa, ditangkap di dalam aliran panas, menyebabkan titrasi yang diikuti destilasi. Standar lain yang masih sesuai adalah dari pensuplai *Quickfit glassware*. Pembangkit panas dirangkai dengan standar laboratorium dengan petunjuk *glassware*, Gambar 3.2c. Seandainya sambungan dasar kaca tidak sesuai, improvisasi dengan penutup karet dan tube gelas sangat memuaskan, meskipun lapisan

pemanas elektrik lebih disukai karena saat mendidih dapat dikontrol lebih baik (C, Gambar 3.2c.) pemanas dengan pembakaran gas dapat diterima karena mendidih dengan mantap. Ini dibantu oleh penggunaan granula *anti bumping* kering oven yang ditambahkan ke pembangkit panas. Aliran dan suhu dari air pendingin kondensor, diharapkan menetes sebagai kondensi pada suhu 30°C. Seandainya ini tidak dapat dilakukan dengan mudah, kurangi aliran panas dengan mengatur laju pemanasan, atau dengan mengurangi sebagian panas dari pembangkit panas.

Titration dilakukan dengan jalur standar biuret yang sesuai, dibagi dalam kelas unit 0,01 mL. Tipe-tipe yang cocok mungkin juga bisa disesuaikan dengan persediaan reagen atau mekanisme pengisian. Sementara ini merupakan keuntungan, tetapi bukan suatu yang istimewa. Sebagai alternatif, biuret pengisap pengontrol elektronik atau manual mungkin dapat digunakan. Ini dapat memberikan hasil titrasi yang lebih teliti, kesalahan-kesalahan titrasi merupakan bagian yang dapat diabaikan dari kesalahan estimasi N. Peralatan yang sesuai adalah *Dosimat* (655 *Dosimat*; Metrohm, Herisau, Switzerland, yang seandainya diinginkan dapat disambung ke otomatis unit titrasi pH; Metrohm Titrator E526).



Gambar 3.2. Peralatan yang digunakan untuk destilasi dan untuk menemukan NH_3 (Setelah Bergersen, 1980). (a) Semikro Kjeldahl rakitan quickfit (labu digesti (A), kapasitas 50-100 mL). (b) Penyuling Markham quickfit (tipe 46 Mc). (c) Rakitan pembangkit panas meliputi 2-3 l labu destilasi (B) pemanas dengan mantel elektrik (C) dan suplai air destilasi yang dihubungkan melalui dua jalur stop cock (X_1). (d) Modifikasi penyuling Markham. Lihat penjelasan.

3.1.4.3. Destilasi

- (a) Sebelum digunakan dianjurkan untuk dibersihkan secara menyeluruh. Pencucian dengan asam chromic, kemudian dibilas dalam 10% (V V^{-1}) HCl dan beberapa kali pencucian dengan air panas, kemudian dibilas beberapa kali dengan air destilasi. Pembangkit panas sebaiknya dibersihkan dengan cara yang sama, sebelum diisi air destilasi separuh dari volumenya. Tambahkan 0,5 L air ke dalam 1 mL H_2SO_4 pekat untuk mencegah kontaminasi dari bekas panas dari pelarutan NH_3 . Level air

dalam pembangkit panas tidak seharusnya diijinkan turun di bawah 50% volume awal. Aliran panas melalui rangkaian destilasi selama 10 menit sebelum destilasi utama.

- (b) Tempatkan 10 mL indikator asam borik ke dalam 150 mL labu erlenmeyer (F, Gambar 3.2.), dan tempat di bawah pembuangan kondensor dengan ujung direndam dalam larutan.
- (c) Biarkan panas mengalir melalui penyuling secara kontinu dengan membuka X_2 dan X_1 (Gambar 3.2c.) pada pembangkit panas, hingga menutup seluruh penyuling panas dan seluruh tetesan kondensi pada permukaan dalam menyerap atau tercuci dengan air bersih kondensasi.
- (d) Tempatkan 5 mL (lihat Tabel 3.1., sehingga mengandung sampel paling sedikit 1 mg N) larutan pencerna pada bagian tempat masuk (Gambar 3.2a., b., d.). Alirkan cairan ke dalam penyuling dengan mengangkat penutup secara perlahan dan membilas dengan air secara perlahan dan teteskan larutan indikator Phenolphthalein.
- (e) Perlahan seperti pada (d) tambahkan 10M NaOH secara cukup untuk memberikan pencerna basa ke dalam phenolphthalein ($\text{pH} > 11$). Untuk 5 mL material tanaman yang dicerna biasanya 8 mL cukup.
- (f) Teruskan pengaliran panas hingga paling sedikit 80 mL hasil destilasi terkoleksi pada labu penerima. Kemudian turunkan labu dan bilas ujungnya dengan air destilasi dari botol pencuci. Koleksi volume yang banyak ini untuk menjamin kelengkapan dari penentuan, tetapi volume tersebut sebaiknya ditingkatkan seandainya volume sampel lebih besar dari 5-10 mL. Amati tindakan pencegahan yang dicatat di atas dengan referen terhadap suhu kondensasi
- (g) Pindahkan labu titrasi dari destilasi
- (h) Angin pembangkit panas dengan membuka pipa X_1 dan menutup X_2 (Gambar 3.2c.) bagian pemasukan dengan air destilasi. Saat panas berkondensasi pada bagian E (Gambar 3.2c.), bagian kosong yang digenerasi mengisap sisa dari destilasi ke E. Segera angkat penutup (5, Gambar 3.2a., b., d.) dan alirkan ke dalam air destilasi dan ulang pencucian ini dua kali. Akhirnya buang kotoran dan cuci hasil koleksi pada J (Gambar 3.2b., d.) melalui pipa kotoran dan ulangi aliran panas secepat mungkin. Catatan : cara ini mungkin meloloskan sisa NaOH yang menempel pada bagian dalam peralatan gelas. Oleh sebab itu sangat penting bahwa pucuk kondensor direndam sebelum penambahan sampel berikutnya sehingga kehilangan NH_3 karena destilasi terlalu dini dapat dihindarkan {lihat (b) di atas}. Adalah juga sangat penting bahwa seluruh panas terkondensasi pada bagian atas peralatan dipindahkan ke

dalam aliran uap air panas sebelum penambahan sampel berikutnya. Rintangan NH_3 terlarut dalam air kondensasi dapat menjadi masalah memperlambat penyelesaian determinasi.

Jika sampel berisi ^{15}N akan didestilasi, penambahan tindakan pencegahan harus diteliti untuk menghindari kemungkinan kontaminasi dari sejumlah sisa NH_3 sangat tinggi terlabel yang tinggal di dalam penyuling.

Beberapa pekerja menyarankan destilasi 15 mL ethanol diantara sampel untuk memindahkan sisa NH_3 yang menempel pada permukaan gelas penyuling. Pada laboratorium kami, tidak ada kombinasi silang antara sampel yang diperkaya telah ditemui dengan modifikasi penyuling Markham (Gambar 3.3., memberikan sejumlah 80 mL destilasi yang terkoleksi untuk setiap sampel. Sampel untuk penghitungan kandungan ^{15}N alam seharusnya didestilasi dengan peralatan yang ditujukan untuk tujuan ini. Sampel yang diperkaya dengan ^{15}N seharusnya diproses dengan penyuling yang berbeda dan juga disarankan untuk mendestilasi kontrol antar sampel : bagian atas peralatan tidak seharusnya dibiarkan dingin sementara kontaminasi dengan sisa NH_3 dari penemuan sampel yang tidak sempurna.

3.1.4.4. Titrasi

Saat hasil destilasi telah cukup dikoleksi (80-100 mL), pucuk kondensor dicuci ke dalam labu dan isinya segera dititrasi dengan HCl standar hingga indikator mencapai warna merah kelabu. Volume titrasi dicatat satu tetes ditambahkan setelah itu indikator sebaiknya mencapai warna merah muda yang jelas.

Kalkulasi keberadaan N adalah :

$$\text{mg N} = \frac{\text{Normalitas HCl standar}}{0,03571} \times 0,5 \times \text{titrasi (mL)}$$

Titrat hasil destilasi adalah sumber N untuk estimasi ^{15}N . Seandainya ini diikuti setiap hasil destilasi seharusnya diasamkan dengan 1-2 tetes 1% H_2SO_4 dan volumenya dikurangi dengan mendidihkan sampai mengandung kira-kira 1 mg N mL^{-1} (Catatan : hindarkan konsentrasi sampel terhadap kekeringan; lihat Tabel 6.1.). Sampel kemudian disimpan dalam kontainer tertutup hingga analisis dilakukan.

3.1.5. Estimasi N pada destilat dengan kolorometrik

Rangkaian kolorometrik yang paling sesuai untuk ammonia-nitrogen dijelaskan di bawah. Cara ini dipercaya mampu menghitung sampai 14 $\mu\text{g N}$ dalam 1 mL sampel.

3.1.5.1. Reagen

A.	Phenol	50 g
	Na Nitroprussida	0,25 g
	H ₂ O destilasi	1 L
B.	NaOH	25 g
	Na hypoklorid	2,1 g
	(28,2 mL dari B.D.H. larutan analisis berisi 0,1 N hypoklorid dalam 0,1 N NaOH atau volume yang setara dari sumber-sumber lain yang sesuai dari hypoklorid dalam NaOH)	
	H ₂ O destilasi	1 L

Penggunaan larutan A dan B (1 bagian) dengan 4 bagian H₂O.

C.	Standar (NH ₄) ₂ SO ₄ (20 $\mu\text{g N mL}^{-1}$)	0,0943 g
	H ₂ O	1 L

3.1.5.2. Prosedur

Buat destilat menjadi 100 mL dalam labu volumetrik. Jika jumlah yang direkomendasikan pada Tabel 3.1. telah digunakan, destilat berisi 10 $\mu\text{g N}$. Tempatkan 1,0 mL dalam tube test ukuran 20 mL. Siapkan satu set standar dalam tube yang mirip dengan tube-tube dengan memipet 0; 0,25; 0,50; 0,75; dan 1,0 mL dari larutan C dan tambahkan air secukupnya untuk mendapatkan volume 1,0 mL. Tambahkan 5 mL larutan A dan B pada setiap tube dan biarkan sampai warna berkembang stabil, paling sedikit selama 30 menit. Catat optikal pengisap pada 625 nm dengan spektrofotometer yang sesuai, siapkan kurva standar dan bacakan nilai destilat ini, dan kalkulasi keberadaan N dalam destilat sebagai berikut :

$$\text{mg N dalam destilat} = \frac{\mu\text{g N dari kurva standar}}{10}$$

3.2. Total nitrogen tanah

Mempelajari fiksasi N_2 di lapang sering ditambah dengan pengetahuan tentang ketersediaan N tanah. Metoda-metoda berikut cocok digunakan saat dilakukan analisis ^{15}N .

3.2.1. Pengambilan sampel

Analisis ini mirip dengan analisis total N pada sampel tanaman dan seprinsip dengan aplikasi sampling dan subsampling. Namun terdapat beberapa perbedaan yang penting. Analisis didasarkan pada sampel tanah berat kering oven, tetapi ada tambahan yaitu hubungan antara kepadatan *bulk* dan kadar lengas perlu dicatat. Untuk mengerjakan ini, sampel biasanya diambil dengan peralatan silinder berlubang yang diketahui diameternya untuk menentukan kedalaman yang pasti. Volume tanah ini ditimbang dengan akurat, dihancurkan dan dicampur dengan baik, disaring dan sub-sampel ditimbang (3-5 g untuk tanah atas) diambil untuk dikeringkan, ditimbang dan didigesti. Sampel dari profil bagian bawah (di bawah 30 cm) biasanya mengandung sedikit N. Sampel tanah yang terlalu basah untuk disaring dan sub-sampel biasanya diencerkan dengan air dan proporsi sub-sampel diketahui dengan volume yang digunakan untuk analisis.

3.2.2. Digesti

Reagen digesti (lihat seksi 3.1.3.1.) (5-10 mL) ditambahkan kedalam sampel tanah kering dalam labu standar *Kjeldahl* dan didigesti dengan gojokan yang sering untuk memisahkan materi mineral yang tinggal di bawah bejana sebagai massa yang padat. Tube digesti hanya mungkin sesuai jika blok pencerna dengan lubang besar sesuai untuk menerima tube-tube dengan diameter 40-50 mm. Jika digesti telah selesai, seluruh isi dicuci ke dalam labu dasar bundar 500 mL dengan satu tangkai disisi badan labu (A, Gambar 3.3.) dan sisa ekstrak dengan bagian air dibiarkan sampai stabil dan supernatan dituang dan ditambahkan untuk dicerna.

3.2.3. Destilasi dan estimasi N

Destilasi dan titrasi atau analisis kolorimetri dilakukan seperti telah dijelaskan di atas (seksi 3.1.4. dan 3.1.5.).

3.3. Mineral nitrogen yang dapat diekstrak

Kepentingan yang lebih besar dari fiksasi nitrogen adalah level N mineral tanah (nitrat dan ammonia). N mineral labil dan menjadi sasaran perbedaan isotop secara reaksi-reaksi biologi dan kimiawi selama transpor dan penyimpanan. Lebih lanjut, level N terekstraksi dapat berubah secara cepat setelah pengambilan sampel (Westfall *dkk.*, 1978). Prosedur berikutnya untuk meminimalkan pengaruh-pengaruh ini dan memberikan persetujuan isotopik yang baik antara N mineral ekstraksi dari tanah dan N asimilasi oleh tanaman dari tanah yang sama telah ditemukan.

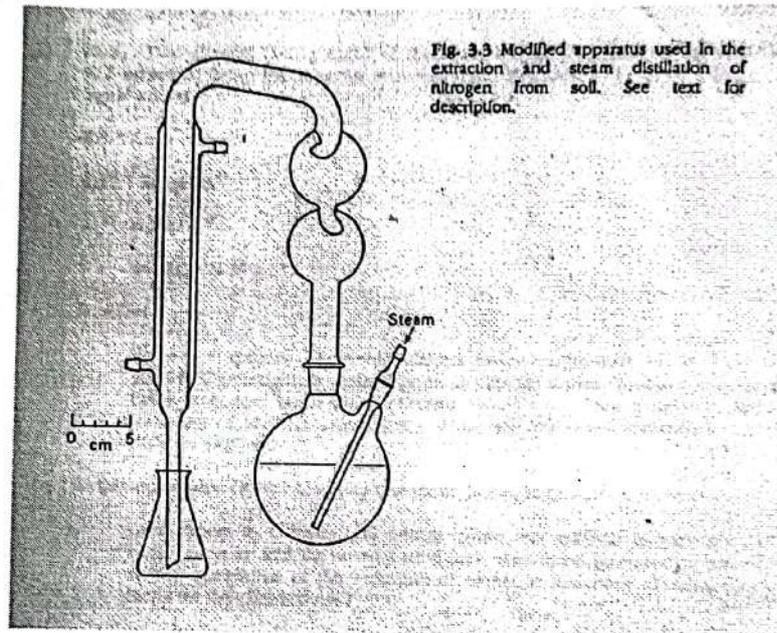


Fig. 3.3 Modified apparatus used in the extraction and steam distillation of nitrogen from soil. See text for description.

Gambar 3.3. Peralatan modifikasi yang digunakan untuk ekstraksi dan destilasi uap panas dari nitrogen tanah. Penjelasan lihat pada teks.

3.3.1. Pengambilan sampel

Sampel dikoleksi dengan sistem *core* seperti dijelaskan di atas. Sampel segera didinginkan, disimpan pada suhu -10°C dan segera mungkin kemudian disimpan dalam bentuk beku hingga pencairan kembali untuk analisis. Secara alternatif, reaksi-reaksi biologis dan kimiawi yang menunjuk di atas mungkin dicegah dengan penambahan reagen ekstraksi dan mencampur secara menyeluruh segera setelah sampling (misal lihat Herridge *dkk.*, 1984). Unsur garam dalam ekstraktan secara efektif mencegah modifikasi biologis dari N mineral. Dalam hal ini *core* paralel diambil untuk estimasi berat basah, berat kering dan kepadatan *bulk*.

Catatan : sampel-sampel kering udara sebaiknya dihindarkan karena pengurangan udara rasio ammonium dan nitrat (yang mungkin diperkaya dengan ^{15}N berbeda) dan kesalahan-kesalahan analitis meningkat oleh peningkatan level ekstraksi N mineral yang banyak (lihat Westfall dkk., 1978).

Seandainya sampel terlalu basah untuk disaring dan dicampur saat diambil dari peralatan *core*, campurkan 300 g sampel *bulk* dengan 100 mL air destilasi untuk membentuk suspensi (*slurry*). Dua *aliquots* (masing-masing 140 g) dari suspensi ditimbang dan 60mL dari 3,5M KCl ditambahkan untuk membuat suspensi encer menjadi 2M. Catat volume cairan yang ditambahkan.

3.3.2. Ekstraksi

3.3.2.1.Reagen

A. Pengekstraksi

2M KCl ($74,55 \text{ g L}^{-1}$)

B. Basa

Siapkan sejumlah MgO segar dan berat (panaskan sampai $400-450^{\circ}\text{C}$ semalam), pada lapisan-lapisan dangkal pada piring keramik. Dinginkan dan simpan pada botol yang ditutup dengan rapat pada desikator tidak lebih dari 1minggu untuk menghindari formasi MgCO_3 . Siapkan suspensi segera 121% (W V^{-1}) dalam H_2O destilasi sebelum digunakan.

C. Devarda's Alloy (bahan kimia laboratorium B.D.H. Poole, Inggris)

Bubuk sampai halus dengan penumbuk pada lumpang. (Catatan : material ini kadang-kadang bervariasi dalam kualitas dan jumlah penggunaan mungkin perlu untuk ditingkatkan dalam rangka menjamin penyelesaian reduksi nitrat menjadi ammonia. Penggilingan yang halus meningkatkan efektivitas).

3.3.2.2. Peralatan

A. Labu erlenmeyer (500mL) dengan penutup karet

B. Penggoyan (*shaker*) dengan gerakan jarum jam

C. Corong gelas dan kertas saring Whatman No. 1

D. Peralatan destilasi dengan uap air seperti digambarkan pada Gambar 3.3. Sebagai alternatif peralatan mungkin dirakit dari komponen-komponen yang dapat disusun kembali dengan cepat. Perkecil bahaya yang salah masuk pada aliran uap air pada cemplungan ganda yang ditunjukkan pada Gambar 3.3. Selama reduksi Devarda's alloy. Penghasil uap air digunakan

dengan Markham (Gambar 3.2c.) digunakan untuk mensuplai uap air pada sisi yang diindikasikan.

E. Pipet 10 mL dengan mulut lebar dibuat dengan pengisian jauh dari ujung pipet standar.

3.3.2.3. Prosedur

Goyang 100 g tanah kering yang telah disaring (atau berat sama dengan tanah basah) dengan 100 mL 2M KCl selama 1 jam pada labu yang ditutup. Saring suspensi dan hitung isi ekstrak (X mL dan koreksi semua hasil berdasarkan pada $V X^{-1}$). Jika tanah tidak subur, atau diambil dari bagian bawah profil tanah, mungkin perlu untuk meningkatkan berat yang diekstraksi dalam rangka menemukan kembali N yang cukup untuk analisis isotop.

3.3.3. Destilasi NH_3

Tempatkan ekstrak pada labu dari peralatan destilasi dan tempatkan 10 mL larutan indikator asam borik dalam labu erlenmeyer 150 mL di bawah saluran keluar kondensor. Kemudian tambahkan dengan pipet kemulut lebar 10 mL suspensi MgO melalui kiri tabung pemanas, sehingga suspensi bergerak di bawah permukaan ekstrak. Hubungkan lajur pemanas dan lewatkan uap air panas dengan kabut hingga paling sedikit 80 mL dari destilat terkoleksi. Pindahkan labu penampung dan ganti dengan lainnya.

3.3.4. Reduksi nitrat dan destilasi NH_3

Dengan pucuk kondensor dicelupkan, dengan hati-hati tambahkan 0,5 g Devarda's alloy melalui lengan kiri tabung pemanas. Segera hubungkan dengan lajur uap air panas dan mulai lagi destilasi lebih jauh hingga 80 mL terkoleksi. Perhatian : pada fase ini sangat penting untuk menghindari kerusakan aliran uap air panas basa dengan kesalahan disebabkan oleh buih. Hal ini akan mengurangi kesalahan titrasi. Masalahnya biasanya diindikasikan oleh titrasi yang besar yang tidak dikehendaki dan atau perubahan warna indikator selama destilasi. Seandainya hal ini tercatat, destilat didestilasi kembali seperti diindikasikan untuk ammonia (bagian 3.3.3.).

3.3.5. Estimasi N

Ini dikerjakan oleh titrasi (seperti pada bagian 3.1.4.4.) atau secara kolorimetri (3.1.5).

4

TEKNIK LARUTAN-SILEM

4.1. Prinsip Metoda

Getah silem membawa senyawa-senyawa yang mengandung unsur N dari akar ke batang leguminosa yang ditanam di lapang berasal dari (i) bintil akar sebagai hasil asimilasi, fiksasi N_2 , dan (ii) N mineral tanah yang diserap oleh akar (Gambar 4.1.). Seandainya terdapat perbedaan-perbedaan yang tetap pada komposisi larutan-N silem antara tanaman-tanaman penfiksasi dan tanaman-tanaman non-penfiksasi yang secara total tergantung pada N tanah, ada kemungkinan untuk membagi rangkaian sistem yang berdasarkan pada analisis getah silem untuk menduga sampai seberapa jauh tanaman tergantung pada fiksasi N_2 atau N mineral tanah.

Ion-ion nitrat dan ammonium adalah 2 bentuk yang paling penting yang diserap akar tanaman baik pada tanah-tanah yang dipupuk maupun tidak. Pada sebagian besar pertanian tanaman pangan dimana nitrifikasi berlangsung cepat, nitrat dipercaya sebagai sumber utama untuk pertumbuhan tanaman. Larutan yang dikirim dari N mineral tanah pada kondisi yang demikian akan ditransportasikan di dalam silem sebagai nitrat bebas atau sebagai produk-produk organik dari reduksi nitrat (utamanya asam amino asparagin) dalam rumput (Gambar 4.1.). Nutrisi ammonium, bagaimanapun, dapat menjadi penting jika leguminosa digunakan sebagai tanaman penangkap pada sistem tanaman padi atau bila ditanam pada tanah masam dengan rasio C : N yang tinggi. Dalam hal ini ammonium mungkin secara cepat bergabung ke dalam senyawa organik (umumnya asam amino) untuk menghindari aksi dari toksiknya dalam sel dan akan disalurkan ke batang di dalam silem dalam bentuk asam amino.

Rentangan yang luas dari perbedaan larutan-N telah diidentifikasi pada eksudat silem yang dikoleksi dari leguminosa berbintil akar yang hanya tergantung pada fiksasi N_2 untuk pertumbuhannya. Bagaimanapun secara umum satu atau dua molekul-molekul kaya N, karakteristik dari species, mendominasi spektrum dari senyawa organik N yang ditransportasikan ke batang dalam getah silem (Gambar 4.2.). Banyak leguminosa asal tropika (Tabel 4.2.) menransport bagian terbesar dari fiksasi N dari bintil akar dalam bentuk *ureides*, *allantoin* dan *asam allantoik* (seperti kedelai, Gambar

4.2.). *Ureides* juga telah dideteksi sebagai komponen minor dari getah silem pada beberapa species (Tabel 4.1.), tetapi sejak eksudat sampel dikoleksi dari beberapa tanaman lapang yang status simbiosisnya tidak diketahui, perbedaan dari *ureides* terhadap ekonomi-N dari tanaman-tanaman ini tidak jelas. Pada sebagian banyak leguminosa lainnya yang telah dipelajari, produksi bintil akar dikirim terutama sebagai amida, asparagin dan glutamin (seperti kacang tanah, Gambar 4.2.).

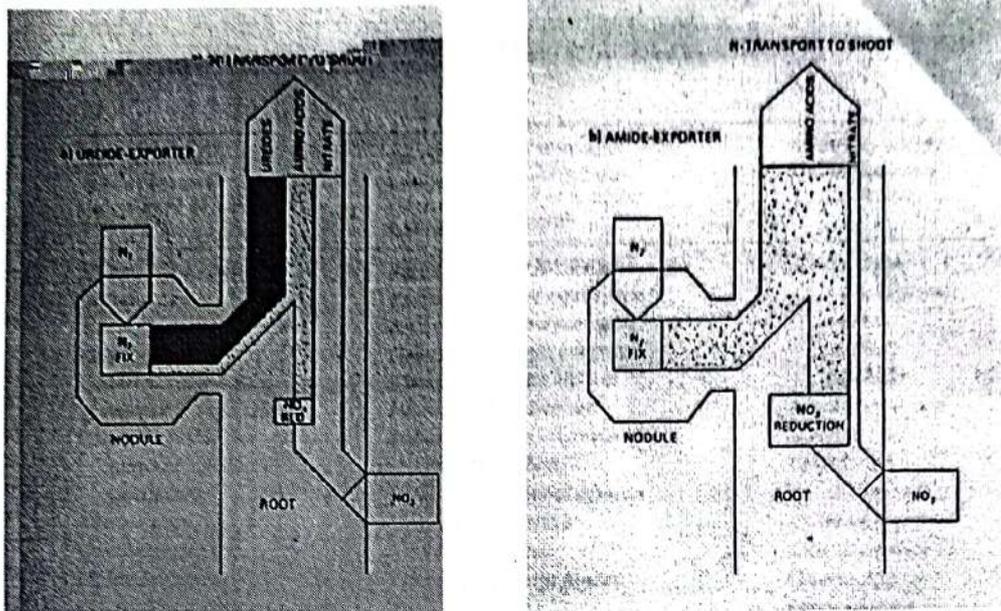
4.1.1. Pengirim Ureida

Aktivitas nitrat reduktase akar secara karakteristik dianggap sebagai pengatur minor dalam asimilasi nitrat dalam species leguminosa yang mengirim ureida dari bintil akar. Konsekuensinya, sebagian besar dari nitrat yang diserap dikirim ke batang dalam bentuk tidak tereduksi (Gambar 4.1a.). Komposisi eksudat silem dari tanaman berbintil akar, oleh karena itu, berubah secara cepat dari yang didominasi oleh ureida ke yang didominasi oleh nitrat dan senyawa amino seperti ketergantungan tanaman terhadap respon penurunan fiksasi N terhadap peningkatan penyerapan nitrat oleh akar (Gambar 4.3.a.b.).

Seperti kandungan relatif ureida (estimasi dari N-ureida sebagai proporsi dari getah N silem, seperti Gambar 4.3c.) dari sampel yang dikoleksi di lapang yang telah digunakan untuk menghitung status fiksasi N_2 dari sejumlah leguminosa dalam kelompok besar dari species tanaman air (Herridge, 1984; Nurhayati *dkk.*, 1988; Rerkasem *dkk.*, 1988).

4.1.2. Pengirim Amida

Respon pengiriman amida leguminosa terhadap perubahan sumber N tidak jelas terdefinisi daripada produksi ureida oleh species sejak produksi fiksasi N_2 dan penyerapan nitrat yang pada dasarnya sama (Gambar 4.1b.). Beberapa pengirim amida memiliki kapasitas reduksi nitrat tinggi dalam akar-akarnya dan spektrum senyawa N yang dikirim di dalam aliran silem tidak terlalu berubah seandainya sumber N untuk pertumbuhan diubah dari N_2 udara ke N mineral tanah (lihat Hansen dan Pate, 1987; Peoples *dkk.*, 1987). Bagaimanapun, pada species lain proporsi pada reduksi nitrat dalam akar lebih rendah dan terdapat peningkatan yang cepat dalam nitrat silem dan penurunan kandungan amida dan asam amino seperti tanaman-tanaman yang makin bertambah mengandalkan penyerapan nitrat dari medium perakaran (Gambar 4.4a.). Pada kondisi ini, derajat relatif dari deteksi nitrat dalam eksudat silem mungkin dianggap menunjukkan kontribusi N tanah ke pertumbuhan tanaman (seperti Gambar 4.4b.).



Gambar 4.1. Jalur transport nitrogen dari sistem perakaran berbintil akar dari (a) pengirim ureida, dan (b) leguminosa pengirim amida bergantung pada simbiosis fiksasi N_2 dan penyerapan nitrat dari tanah untuk pertumbuhan. Area pengindikasi reduksi nitrat adalah sebanding terhadap tingkat relatif dari metabolisme nitrat dalam akar dari species setiap klas leguminosa (setelah Ledgard dan Peoples, 1988).

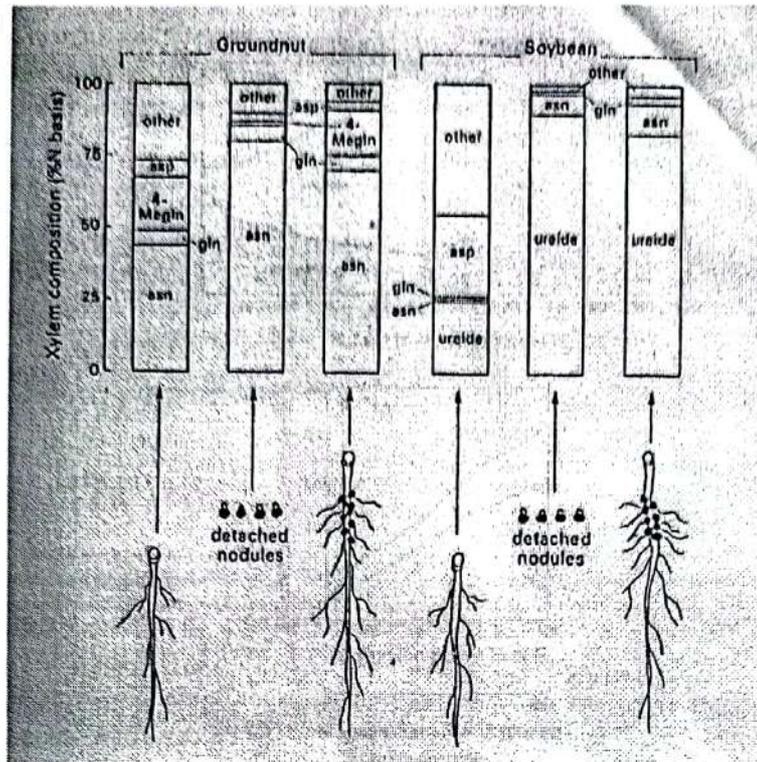
Tabel 4.1. Kejadian ureida dalam silem pada leguminosa berbintil akar^a

Species dimana ureida merupakan komponen utama dari larutan N ^b	Species dimana ureida telah dideteksi sebagai komponen minor ^c	Species dimana ureida belum dideteksi
<i>Albizia lophantha</i>	<i>Albizia falcataria</i>	<i>Acacia alata</i> <i>auriculaformis, extensa</i> <i>insauvis</i> <i>pulchella</i>
<i>Cajanus cajan</i> <i>Calopogonium caeruleum</i> <i>Centrosema spp.</i>	<i>Bossiaea aquifolium</i> <i>Erythrina variegata</i> <i>Flemingia congesta</i>	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Bauhinia spp.</i> <i>Caesalpinia calothyrsus</i> <i>Calliandra spp.</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Clitoria spp.</i>
<i>Codaricalyx gyroides</i> <i>Cyamopsis tetragonoloba</i> <i>Desmodium discolor</i> <i>rensonii,</i> <i>uncinatum</i>	<i>Gliricidia sepium</i> <i>Pisum arvense</i> <i>Sesbania rostrata</i> <i>sesban</i>	<i>Derris elliptica</i> <i>Juncea spp.</i>
<i>Glycine max</i> <i>Hardenbergia spp.</i>	<i>Stylosathes hamata</i> <i>Vicia ervilia</i> <i>sativa</i>	<i>Lathyrus cicera</i> <i>sativus</i>
<i>Lablab purpureus</i>	<i>Viminaria juncea</i>	<i>Leucaena spp.</i> <i>Lens culinaris</i> <i>Lotus corniculatus</i>
<i>Macroptilium artropurpureum</i> <i>Macrotyloma uniflorum</i> <i>Pueraria javanica</i> <i>phaseoloides</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>lunatus</i>		<i>Lupinus albus</i> <i>angustifolius</i> <i>cosentinii</i> <i>mutabilis</i> <i>Medicago minima</i> <i>sativa</i> <i>Mimosa pigra</i> <i>Pisum sativum</i>
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>		<i>Sesbania glandiflora</i> <i>Trifolium prasente</i> <i>subterranean</i> <i>repens</i> <i>Vicia monantha</i> <i>faba</i> <i>Zornia spp.</i>
<i>Tedhegi spp.</i> <i>Vigna angularis</i> <i>mungo, radiata, triloba,</i> <i>unguiculata, umbellata</i> <i>Voandzeia subterranea</i>		

^a Informasi didapatkan dari Norhayati dkk. 1988; Peoples dkk. 1988b; data tidak dipublikasikan dari M.B. Peoples, R.R. Gault, D.F. Herridge dan B. Palmer

^b 40% atau lebih total N getah silem diestimasi sebagai ureida

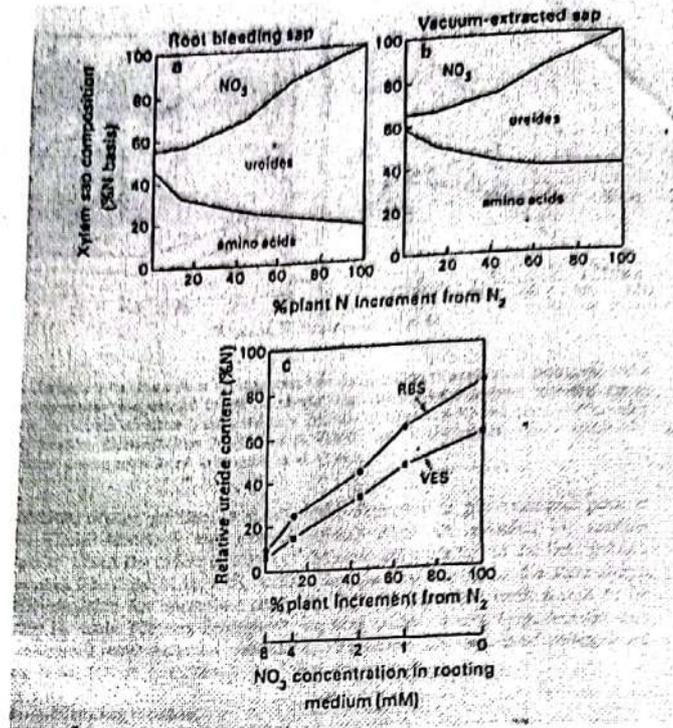
^c 10-25% total N getah silem yang dikoleksi dari tanaman yang ditumbuhkan di rumah kaca atau di lapang diestimasi sebagai ureida



Gambar 4.2. Komposisi proporsional dari senyawa-senyawa nitrogen dalam eksudat silem kacang tanah (*Arachis hypogaea* L) dan kedelai (*Glycine max* (L) Merr). Eksudat silem dikoleksi sebagai getah yang dikeluarkan dari tanaman yang dipotong pada bagian pucuk akar, atau pada tempat di akar di bawah bintil akar paling bawah, atau dari bintil akar yang dipisahkan (setelah Peoples 1986, 1988a). Asn = asparagine, Gln = glutamine, Asp = Asam aspartik, 4-Megln = 4 Methylene glutamin, lainnya = asam-asam amino lain.

Sebelum teknik larutan silem digunakan untuk menghitung fiksasi N_2 dari leguminosa yang ditanam di lapang, 3 persyaratan dasar adalah penting :

- (i) Peralatan dari pengambilan larutan N silem
- (ii) Sebuah kurva kalibrasi yang berhubungan dengan komposisi larutan silem terhadap ketergantungan leguminosa pada fiksasi N_2 dengan adanya N tanah; dan
- (iii) Pengetahuan dari keuntungan dan kemungkinan pembatasan pada aplikasi metodologi



Gambar 4.3. Perubahan dalam komposisi larutan N getah silem yang dikoleksi sebagai (a) pengeluaran eksudat akar, atau (b) ekstraksi vakum dari batang kedelai berbintil akar yang diberi makan dari level nitrat secara terus menerus dan (c) hubungan antara kelimpahan ureida dan tanaman yang tergantung pada fiksasi N₂. Kandungan ureida relatif dari pengeluaran getah akar (RBS) dan getah yang diekstraksi dengan vakum (VES) diekspresikan sebagai proporsi dari total N getah (ureida-N + α-amino-N + nitrat-N). Diperoleh dari data Herridge (1984) setelah Peoples *dkk.* (1988a).

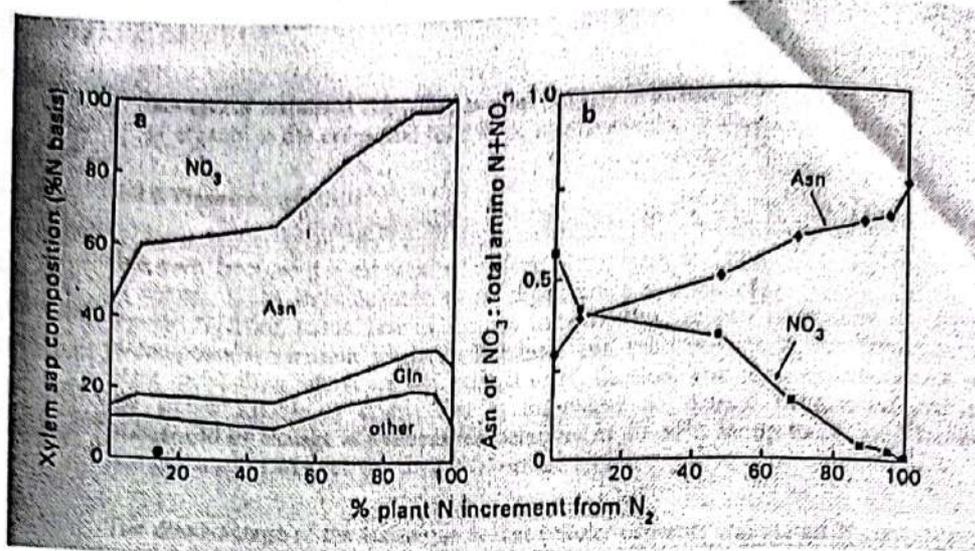
4.2. Pengambilan Sampel dari Larutan N

Adalah mungkin untuk mengkoleksi eksudat silem sebagai pengeluaran eksudat secara spontan dari keseluruhan ujung akar tanaman leguminosa setelah dipisahkan dari tunas tanaman yang tumbuh di dalam rumah kaca atau tanaman-tanaman yang tumbuh di lapang di tropika basah (seperti Norhayati *dkk.*, 1988). Bagaimanapun, sulit untuk mendapatkan kembali pengeluaran eksudat akar dari tanaman-tanaman yang tumbuh di lapang pada lingkungan yang berbeda sebelum pengairan *plot* lapang mungkin membantu tanaman untuk mengeluarkan tetapi tidak selalu sesuai atau tidak menjamin keberhasilan. Kesimpulannya metoda-metoda alternatif untuk pengambilan sampel eksudat silem telah diuji. Satu teknik untuk pengambilan sampel

larutan N meliputi persiapan ekstrak encer dari jaringan tanaman (Herridge, 1982; Peoples *dkk.*, 1987). Bagaimanapun, prosedur memerlukan koleksi, pengeringan, penggilingan dan ekstraksi material tanaman sebelum di analisis di laboratorium. Kesulitan-kesulitan dan tahapan yang memakan waktu ini dihindari oleh teknik-teknik lain, dimana kandungan silem dari batang di ekstraksi di lapang dengan menggunakan vakum ringan (Herridge *dkk.*, 1984, 1988). Getah dipindahkan dari rangkaian silem batang cocok untuk analisis dalam waktu dekat. Teknik telah ditemukan untuk dapat dipakai untuk banyak leguminosa berbeda yang ditanam di lapang pada kondisi lingkungan yang berbeda-beda (seperti kekeringan dan genangan air). Prosedur tiga metoda dari pengambilan larutan N dijelaskan pada seksi berikutnya.

4.2.1. Pengeluaran eksudat akar

- (a) Potong tunas di bawah buku pertama dekat dengan tanah dengan pisau tajam atau sepasang *secateurs*.
- (b) Tempatkan silikon atau tube berlengan dari karet, panjang 2-4 cm dengan diameter dalam sedikit lebih kecil dari batang, setelah ujung akar dibuka (A, Gambar 4.5.).
- (c) Tetesan getah di bawah tekanan akar (B, Gambar 4.5.) dapat dengan mudah dikoleksi dari penampung tabung berlengan dengan menggunakan pipet *pasteur* atau alat penyemprot (syring. C, Gambar 4.5.). Disarankan untuk membuang tetesan getah selama menit-menit pertama dari pengeluaran untuk mengurangi kontaminasi dari pemotongan sel-sel batang. Juga direkomendasikan bahwa ujung-ujung akar dibiarkan untuk mengeluarkan getah tidak lebih dari 20-30 menit sebelum koleksi karena perubahan-perubahan komposisi larutan N yang mungkin terjadi setelah periode panjang dan pengeluaran dapat menimbulkan kesalahan pada analisis berikutnya dan interpretasi dari data silem. Eksudat yang diakumulasikan sebaiknya dikoleksi setiap beberapa menit dan ditempatkan dalam tabung tersegel atau vial (botol kecil) yang disimpan pada es untuk mengurangi potensi dekomposisi atau metabolisme komponen-komponen N silem.
- (d) Sampel getah seharusnya dijaga kedinginannya pada es sehingga membeku pada -15°C untuk waktu penyimpanan yang lama atau stabilkan segera setelah koleksi dengan mencampurkan ethanol dengan volume yang sama pada tabung koleksi jika es tidak tersedia.



Gambar 4.4. Perubahan pada (a) komposisi larutan N eksudat silem kacang tanah yang diberi makan dengan pemeliharaan level nitrat secara konstan, dan (b) hubungan antara asparagine silem atau kecenderungan nitrat (diekspresikan sebagai fraksi dari total getah N) dan tanaman tergantung pada fiksasi N_2 . Diperoleh dari Peoples *dkk.* (1986). Asn = Asparagine, Gln = Glutamine, Lain = asam-asam amino lain yang terdaftar dalam Peoples *dkk.* (1986).

4.2.2. Ekstraksi Jaringan

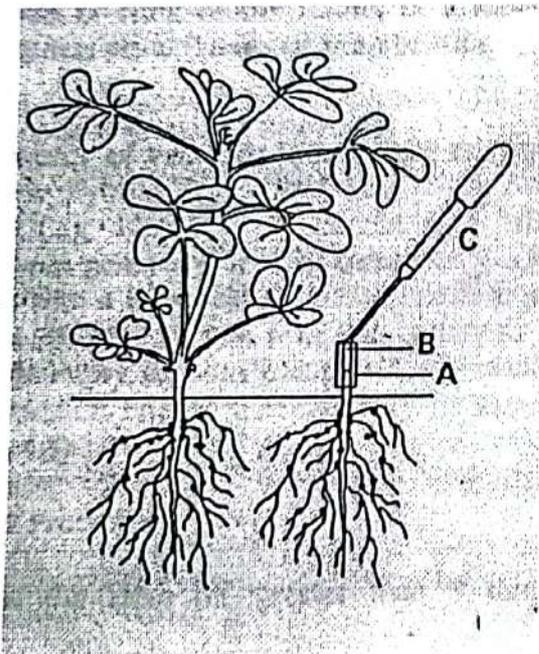
Batang sangat sesuai sebagai organ target saat teknik ini digunakan untuk menduga status fiksasi N_2 pada leguminosa, karena batang pada dasarnya berperan dalam transport dan untuk mengurangi penyimpanan larutan lebih lama. Daun tidak sesuai, daun-daun dengan cepat memetabolis senyawa N yang baru masuk; oleh karena itu variasi larutan N pada jaringan dapat menyimpulkan perubahan-perubahan pada metabolisme tanaman yang tidak berhubungan dengan fiksasi N_2 . Komposisi relatif komponen N terlarut dalam batang tidak sensitif terhadap fluktuasi harian dan tidak berubah karena penyimpanan pada suhu 20-30°C selama 24 jam karena untuk pengeringan ditempatkan pada oven (Herridge 1982).

Kerugian dari teknik ini adalah bahwa sel mengandung dan menyimpan senyawa-senyawa N diekstraksi ditambahkan ke unsure utama silem. Oleh karena itu, metoda ini tidak mungkin memberikan perhitungan penampilan simbiosis sesensitif dengan *assay* sepadan yang dikembangkan semata-mata berdasarkan analisis getah silem. Namun demikian cara ini mungkin

merupakan metoda yang cocok untuk pengambilan larutan N di lapang dari tanaman yang sangat kecil atau species leguminosa dimana getah silem mungkin tidak dengan mudah dapat ditemukan kembali dengan vakum atau pengeluaran getah secara spontan (seperti kacang tanah, *lentil* dan *pea*).

4.2.2.1. Prosedur

- (a) Panen material tajuk dan pindahkan daunnya (Catatan : simpan daun-daun dalam tas yang dilabel secara terpisah seandainya determinasi N total tanaman diperlukan; seksi 3.1.).
- (b) Tempatkan sampel batang dalam tas yang dilabel dengan jelas dan keringkan pada 75-80°C dalam oven bertekanan udara selama 2 hari.
- (c) Catat berat kering total seandainya analisis *Kjeldahl* diperlukan kemudian, tumbuk jaringan sampai melalui saringan dengan ukuran 60 *mesh* (1 mm).



Gambar 4.5. Koleksi penyadapan getah silem akar. Karet silikon berbentuk tube dengan ukuran yang sesuai (A) ditempatkan di atas pucuk akar terbuka setelah tajuk dipisahkan. Getah memancar ke dalam tabung (B) dapat dikoleksi dengan pipet *Pasteur* (C).

4.2.2.1. Ekstraksi

- (a) Timbang 0,5 g sub-sampel kering dan tumbuk material batang dan pindahkan pada 100 mL labu erlenmeyer atau beker gelas.

- (b) Tambahkan 25 mL air destilasi pada setiap sub-sampel dan panaskan selama 1-2 menit.
- (c) Titrasi pada saat panas melalui corong dilapisi kertas filter berukuran 15 cm (Whatman No. 40) ke dalam sebuah labu volumetrik berukuran 50 mL. Cuci residu pada filter dan bilas dengan sedikit air destilasi.
- (d) Ketika isi labu dingin, buat sampai volume menjadi 50 mL dengan air destilasi.
- (e) *Eluant* dapat disimpan dalam waktu yang tidak terbatas dalam vial kecil atau labu dalam freezer sampai analisis larutan N dilakukan.

4.2.3. Ekstraksi eksudat dengan vakum

Teknik ini telah dikarakterisasi secara ekstensif untuk kedelai pengirim ureida (Herridge 1984; Herridge *dkk.* 1988) dan kacang gude (Peoples *dkk.* 1989). Komposisi relatif larutan N dari sampel silem yang diekstraksi di lapang tidak berubah sepanjang siang hari antara 9 pagi sampai 4 siang dan tidak dipengaruhi oleh level penggunaan vakum. Pada umumnya setiap ulangan pengambilan sampel mewakili koleksi yang banyak 8 – 12 tanaman; tetapi untuk menyelesaikan analisis larutan N sering dapat ditemukan kembali cukup eksudat silem dari setiap batang dewasa; leguminosa yang tumbuh di lapang ($0,5-1\text{mL tanaman}^{-1}$). (seksi 4.3.1.) sehingga metoda ini mungkin juga dapat digunakan pada tanaman secara individu (Herridge *dkk.* 1988).

4.2.3.1. Peralatan yang diperlukan

Hal-hal berikut diperlukan :

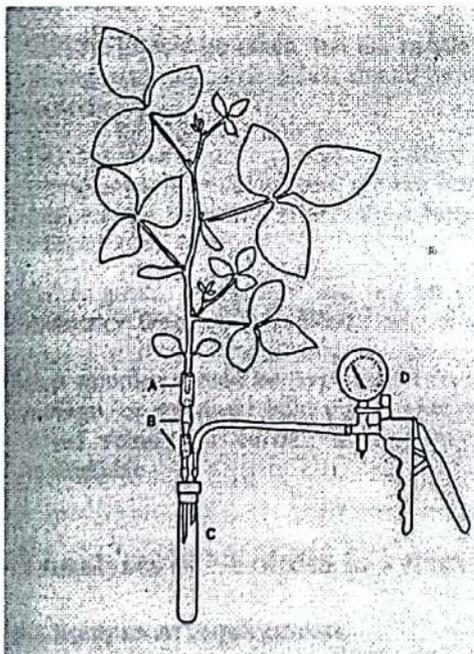
- *Secateurs* tajam atau gunting pemangkas yang besar
- Jarum syringe (ukuran 19 atau 20)
- Silikon atau karet berbentuk tabung dengan kisaran diameter dalam (3-15 mm) dan fittings atau adaptor yang cocok (seperti mikro pipet yang tidak digunakan dan dipotong ujungnya)
- Kontainer vakum 5 mL (Becton Dickenson, Rutherford, New Jersey, USA)
- Sumber vakum. Di lapang ini mungkin sebuah pompa vakum tangan (seperti, Nalgene, Sybron corp., Rochester, New York, USA seperti digambarkan pada gambar 4.6.), sebuah pompa kaki (seperti Plate 4.1.) atau

terdiri dari pompa vakum laboratorium yang didayakan oleh sebuah generator yang dijalankan dengan bahan bakar atau baterai motor (seperti Waters/ Millipore DOA-V130-BN pompa vakum dengan generator kawasaki GA 1000A yang mudah dibawa, atau pompa diagram thomas model 907 CDC 18 dengan sebuah baterai 12 volt seperti digambarkan pada Plate 4.2.). Keuntungan dari pompa vakum laboratorium adalah merupakan pompa yang bermulut banyak yang dapat digunakan untuk menyediakan lebih dari 1 lajur sehingga getah dapat diambil sampelnya dari beberapa tanaman secara bersama-sama (Plate 4.3.).

4.2.3.2. Prosedur

- (a) Potong batang dengan gunting dekat dengan tanah (diameter > 3 mm untuk menjamin kelayakan koleksi volume getah). Seandainya buku pada dasar batang padat (panjang ruas < 10 mm) lebih disukai untuk memotong batang di atas buku paling rendah, atau menggunakan lateral untuk ekstraksi vakum berikutnya seperti penemuan kembali getah sering dibatasi oleh penambahan daya tahan silem yang terjadi seperti pada pertemuan pembuluh.

Catatan : N tajuk total dapat ditentukan dari sampel yang sama jika peneliti yang bekerja memiliki lebih banyak lembaran plastik atau tempat penyimpanan sehingga pemotongan daun dan batang dari step (d) dapat dikoleksi setelah pengambilan contoh pada setiap ulangan dan disimpan.



Gambar 4.6. Prosedur ekstraksi eksudat silem batang. Dasar batang segar dipisahkan dan ditempatkan ke dalam tabung berkaret silikon yang sesuai (A) dan dimasukkan ke dalam jarum penyemprot (menggunakan sebuah adaptor (B) seandainya diperlukan). Jarum penyemprot kemudian dimasukkan melalui lubang pemvakum (C) dihubungkan ke pompa (D) melalui penghubung lain jarum penyemprot.

- (b) Batang yang terpisah kemudian dimasukkan dengan segera ke dalam seluruh silikon atau pipa karet dengan diameter dalam sedikit lebih kecil dari batang (A, Gambar 4.6.), dan cocokkan pada jarum penyemprot dengan menggunakan adaptor dengan ukuran yang cocok (B, Gambar 4.6.).
- (c) Kemudian jarum ditekan melalui penutup karet dari 5 mL kontainer vakum (C, Gambar 4.6.) yang telah dihubungkan dengan pompa vakum (D, Gambar 4.6.) melalui sambungan jarum penyemprot lain dan pipa plastik yang fleksibel. *Catatan* : dasar jarum penyemprot tidak harus rata kecuali getah dimasukkan ke dalam pipa pompa vakum daripada ditampung kontainer vakum.
- (d) Vakum sebagian diaplikasikan dan segmen-segmen pendek (3-4 cm) kemudian dipotong dengan gunting berturut-turut dari atas ke bawah dari tajuk (Gambar 4.4.) untuk mengijinkan udara masuk pada permukaan bagian yang dipotong, jadi penggantian getah silem dari dasar batang dikoleksi ke dalam penampung vakum.
- Catatan* : (i) Teknik tidak akan bekerja seandainya tanaman dirasuk hama seperti batang *borers* karena hal ini tidak akan mungkin untuk memelihara vakum pada batang
- (ii) Kepedulian harus diberikan sehingga jamur tidak di blok dengan *debris* selama ekstraksi. *Debris* seharusnya sering dibersihkan dan jarum diganti secara periodic
- (iii) Adalah penting bahwa ekstraksi vakum dari batang yang mengandung silem dimulai segera setelah pemisahan batang dari akar. Pemindahan lebih dari 5 menit dapat menimbulkan kesalahan-kesalahan pada analisis berikutnya (lihat Herridge *dkk.* 1988; Peoples *dkk.* 1989)
- (iv) Volume getah yang lebih besar dapat dikoleksi jika daun dipisahkan sebelum ekstraksi (Peoples *dkk.* 1989)
- (e) Sampel getah sebaiknya disimpan dalam kondisi dingin pada es hingga membeku pada suhu -15°C dalam penyimpanan jangka panjang, atau stabilkan segera setelah ekstraksi dengan penambahan ethanol kira-kira volume yang sama ke dalam getah yang dikoleksi dalam penampung vakum jika es tidak tersedia.

4.3. Analisis larutan N dalam eksudat silem dan ekstrak jaringan

4.3.1. Peralatan yang diperlukan

Hal-hal berikut diperlukan sebelum memulai rangkaian analisis larutan-N dijelaskan di bawah :

- Timbangan berat dengan akurasi sampai 0,1 mg
- Rak metal untuk tabung test dan tabung test gelas (misalnya 150 x 18 mm)
- Pipet kecil dan ujung-ujungnya (seperti Gilson Pipetman, Perancis), dan atau *dispenser* (seperti, Wheaton Zippette, Inggris) untuk mengcover rentangan yang diinginkan
 - 2-20 μ l
 - 50-200 μ l
 - 0,2-1 mL
 - 1-5 mL
- Bak pemanas
- Bak es air dingin (seperti, es dalam kotak berbusa) atau bak air yang didinginkan
- Spektrofotometer atau kolorimeter

4.3.2. Ureida total

(Pustaka : Young dan Conway, 1942).

4.3.2.1. Reagen

A. 0,5 M NaOH	
NaOH (derajat analitis)	20 g
Air destilasi	1 L
B. Phenylhydrazine hydrochloride	
Phenylhydrazine hydrochloride	0,33 g
Air destilasi	100 mL

Dibuat segar pada setiap analisis. Simpan labu berisi persediaan larutan ditutup dengan foil tipis segera sesudah digunakan. Simpan dengan pengawet di dalam freezer.

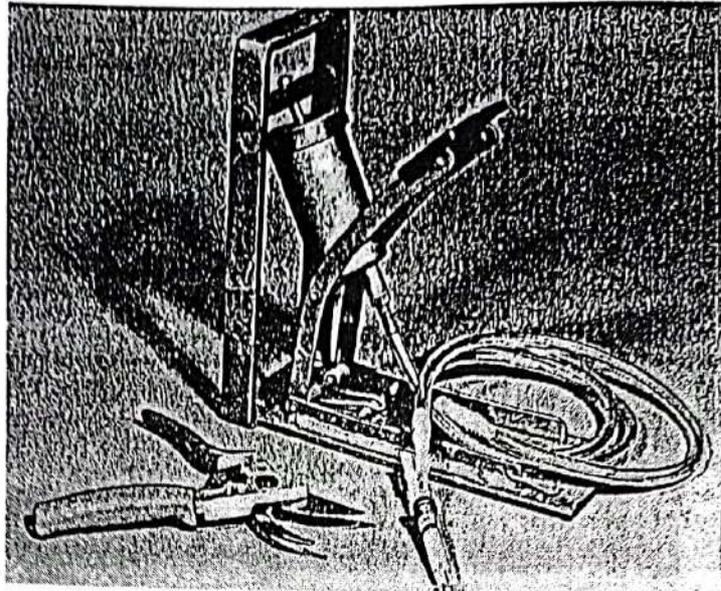


Plate 4.1. Alat yang digunakan untuk mengekstrak getah silem dari batang secara vakum. Pompa vakum kaki, *secateurs*, pemvakum, dan *fittings*. Pompa kaki dibuat dari pompa ban mobil dengan membalik penghisap sehingga pompa mengalirkan udara daripada menyemprotkannya. Sebuah katup yang tidak balik dimasukkan ke dalam tube plastik masuk ke pemvakum sehingga vakum dapat dipelihara selama ekstraksi.

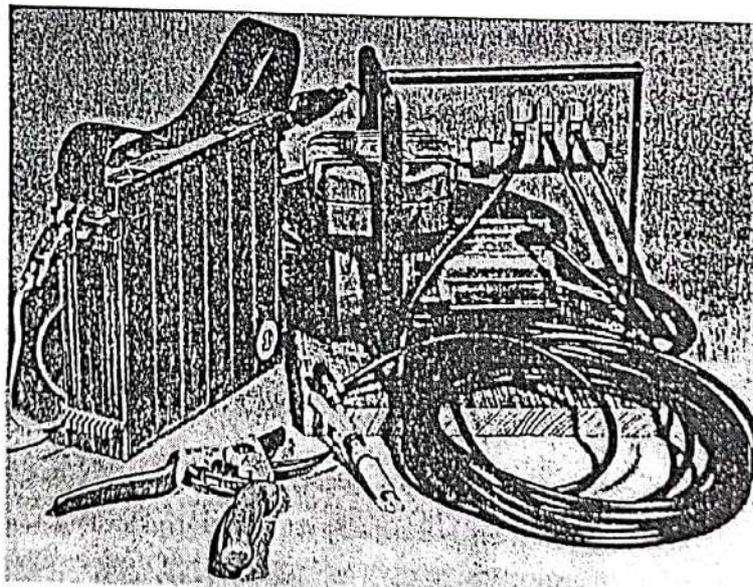


Plate 4.2. Alat yang digunakan untuk mengekstrak getah silem dari batang secara vakum. Diagram pompa vakum dengan pipa bermulut banyak dan tiga jalur vakum, baterai 12 volt yang dapat diisi kembali, *secateurs*, pemvakum, dan *fittings*.

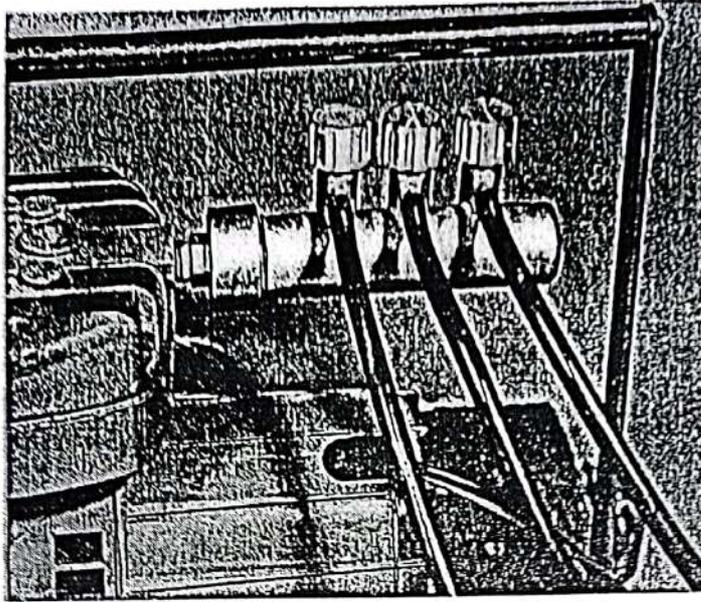


Plate 4.3. Detail pipa bermulut banyak di laboratorium pompa vakum. Pengisap melalui setiap tiga jalur vakum dikontrol dengan katup pada pipa bermulut banyak dan atau jarum katup pada setiap akhir jalur.



Plate 4.4. Ekstraksi secara vakum getah silem dari batang. Sekali vakum digunakan untuk memotong dasar batang, daun-daun dibuang dan batang dipotong menjadi segmen-segmen pendek dengan *secateurs* secara berurutan dari atas ke bawah. Getah silem dikoleksi dari batang dengan menggunakan pemvakum.

C. 0,65 M HCl	
HCl pekat (32% W W ⁻¹)	6,5 mL
Larutan dengan air destilasi sampai	100 mL

Dibuat segar pada setiap analisis. Simpan labu berisi persediaan larutan ditutup dengan foil tipis segera sesudah digunakan.

D. Kalium Ferri Cianida	
Kalium Ferri Cianida	0,833 g
Air destilasi	50 mL

E. 10M asam hydrochlorida pekat (32% W W⁻¹)

F. Standrad Allantoin

Siapkan 1 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ dari persediaan larutan allantoin segar setiap kali analisis

Allantoin (simpan dengan pengawet)	15,8 μg
Air destilasi	100 mL

Persediaan larutan

1 mL – 100 mL	dengan air destilasi (10 nmol mL ⁻¹), 2,5 mL sampel untuk analisis = 25 nmol
2 mL – 100 mL	dengan air destilasi (20 nmol mL ⁻¹), 2,5 mL sampel untuk analisis = 50 nmol
3 mL – 100 mL	dengan air destilasi (30 nmol mL ⁻¹), 2,5 mL sampel untuk analisis = 75 nmol
5 mL – 100 mL	dengan air destilasi (50 nmol mL ⁻¹), 2,5 mL sampel untuk analisis = 125 nmol
10 mL – 100 mL	dengan air destilasi (100 nmol mL ⁻¹), 2,5 mL sampel untuk analisis = 250 nmol

Catatan : selalu termasuk 2,5 mL air destilasi kosong dengan standar selama analisis. Sebelum kerja dengan rangkaian ureida, standar penuh harus dioperasikan melalui (0-250 nmol) untuk mengontrol respon linier.

4.3.2.2. Prosedur

Jika perkembangan warna tidak stabil (lihat di bawah) disarankan untuk menganalisis ureida sejumlah 20-30 sampel termasuk 2 sampel air kosong dan paling sedikit 3 standar ureida (misalnya 10, 20, dan 50 nmol mL⁻¹).

- (a) Tempatkan 0,2 mL ekstrak jaringan air panas atau 0,05-0,1 mL sampel eksudat silem ke dalam setiap tabung test dan dilarutkan sampai 2,5 mL dengan air destilasi (gunakan 2,5mL dari setiap standar ureida dan 2,5 mL untuk air kosong).
- (b) Tambah 0,5 mL 0,5M NaOH
- (c) Campur dan tempatkan tabung-tabung ke dalam bak pemanas air selama 10-15 menit
- (d) Pindahkan tabung-tabung dan biarkan dingin pada suhu kamar, kemudian tambah 0,5 mL 0,65M HCl dan 0,5 mL larutan *phenylhydrazine* pada tiap tabung
- (e) Campur dan letakan tabung-tabung ke dalam bak pemanas air selama 2-4 menit
- (f) Pindahkan dari bak pemanas air dan celupkan tabung-tabung ke dalam bak es selama 15 menit. Kecepatan pendinginan adalah faktor penting dalam perkembangan warna akhir. Jika memungkinkan sebaiknya digunakan campuran es dan garam (tinggalkan reaksi untuk beberapa saat pada fase ini seandainya diperlukan)
- (g) Pindahkan dari bak es dan tambahkan 2 mL HCl pekat (juga dinginkan sampai 0°C) dan 0,5 mL Kalium Ferri Cianida.
- (h) Campurkan segera setelah setiap penambahan Kalium Ferri Cianida.
- (i) Baca pada kepadatan optik (*absorbance*) pada 525 nm pada spektrofotometer setelah 10 menit pada suhu kamar. *Perkembangan warna tidak stabil. Intensitas warna hilang 10-15% dalam 60 menit. Oleh karena itu, disarankan setiap kali merangkai beberapa sampel yang dapat di baca secara menyenangkan dalam waktu sekitar 20 menit*
- (j) Kandungan ureida total sampel ditentukan dari kurva standar allantoin yang telah disiapkan (250 mol standar seharusnya diberikan dalam pembacaan kepadatan optikal antara 0,1-1,4), dan sebuah faktor koreksi digunakan (yaitu, jika 0,05 mL sampel digunakan, faktornya adalah 1,0 0,05⁻¹ = x 20) untuk merubah sampel dalam nmol ke dalam nmol mL⁻¹.

4.3.3. Metoda asam amino ninhydrin total

[Pustaka : Yemm dan Cocking (1955). Adaptasi metoda dijelaskan di bawah di dalam Herridge (1984)].

4.3.3.1. Reagen

A. 0,2M penyangga sitrat

Asam sitrat	21 g
NaOH (derajat analitis)	8 g
Air destilasi	500 mL
Kontrol pH dan atur jika perlu sampai 5,0	

B. Reagen ninhydrin

0,01M K sianida (65 mg dalam 100 mL air destilasi stabil selama 3 bulan pada 20°C, jangan dipipet dengan mulut)	10 mL
metoksi ethanol (derajat analitis)	590 mL
ninhydrin	5 g

Reagen ninhydrin sebaiknya disiapkan paling tidak 24 jam sebelum digunakan. Reagen sangat sensitif terhadap sinar dan sebaiknya disimpan jauh dari sinar dalam botol gelas berwarna coklat. Stabilkan selama hanya 2 minggu pada suhu kamar. Penstabilan dapat diperpanjang dengan menyimpan pada suhu 4°C.

C. Standar asam amino

Siapkan 2,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ baru setiap analisis, 50 : 50 asparagine : glutamine larutan persediaan (biasanya senyawa-senyawa amino dalam getah silem)

Asparagine (simpan dengan pengawet)	16,5 mg
Glutamine (simpan dengan pengawet)	18,2 mg
Air destilasi	100 mL

Persediaan larutan

0,1 mL – 10 mL	dengan air destilasi (25 nmol mL^{-1}), 0,5 mL sampel untuk analisis = 12,5 nmol
0,2 mL – 10 mL	dengan air destilasi (50 nmol mL^{-1}), 0,5 mL sampel untuk analisis = 25 nmol
0,4 mL – 10 mL	dengan air destilasi (100 nmol mL^{-1}), 0,5 mL sampel untuk analisis = 50 nmol
1,0 mL – 10 mL	dengan air destilasi (250 nmol mL^{-1}), 0,5 mL sampel untuk analisis = 125 nmol
2,0 mL – 10 mL	dengan air destilasi (500 nmol mL^{-1}), 0,5 mL sampel untuk analisis = 250 nmol

4.3.3.2. Prosedur

- Tempatkan 0,5 mL sampel pada tiap tabung test (20-50 μl getah silem + 450-480 μl air destilasi). Untuk persiapan kurva asam amino standar gunakan 0,5 mL dari setiap standar asam amino dan ulangi dengan 0,5 mL air kosong.
- Tambah 1,0 mL 0,2M penyangga sitrat (pH 5,0), dan
- Tambah 1,2 mL reagen ninhydrin
- Campur secara baik dan tempatkan dalam bak air pemanas selama 10-15 menit
- Pindahkan dari bak air dan dinginkan sampai suhu kamar
- Baca kepadatan optikal (*absorbance*) spektrofotometer pada 570 nm
- Kandungan asam amino total sampel dari kurva standar asam amino (250 nmol standar seharusnya diberikan pada pembacaan kepadatan optikal sekitar 1,2), dan sebuah faktor koreksi yang digunakan (yaitu jika 0,05 mL sampel digunakan, faktornya = $1,0 \cdot 0,05^{-1} = \times 20$) untuk merubah sampel dalam nmol ke dalam nmol mL^{-1} .

4.3.4. Metoda asam salisiklik untuk penentuan nitrat

(Pustaka : Cataldo *dkk.* 1975). Sampai saat ini sesuai untuk contoh getah silem semua leguminosa kecuali kacang gude, yang memerlukan prosedur reduksi metal seperti dijelaskan oleh Herridge (1984) untuk penentuan nitrat secara akurat.

4.3.4.1. Reagen

A. Asam salisiklik (5% W V⁻¹)

Asam salisiklik

5 g

Asam sulfat pekat

100 mL

Adalah baik jika reagen asam salisiklik disiapkan beberapa hari sebelum penggunaan. Sekali disiapkan seharusnya distabilkan selama beberapa minggu.

B. 2M NaOH

NaOH (derajat analitis)

40 g

Air destilasi

100 mL

C. Standar nitrat

Siapkan larutan standar KNO₃ 25 μmol mL⁻¹

KNO₃

0,253 g

Air destilasi

100 mL

(NaNO₃ mungkin digunakan jika KNO₃ tidak tersedia)

Persediaan larutan

1 mL – 10 mL	dengan air destilasi (2,5 nmol mL ⁻¹), 0,05 mL sampel untuk analisis = 0,125 μmol
2 mL – 10 mL	dengan air destilasi (5,0 nmol mL ⁻¹), 0,05 mL sampel untuk analisis = 0,25 μmol
4 mL – 10 mL	dengan air destilasi (10 nmol mL ⁻¹), 0,05 mL sampel untuk analisis = 0,50 μmol
6 mL – 10 mL	dengan air destilasi (15 nmol mL ⁻¹), 0,05 mL sampel untuk analisis = 0,75 μmol
8 mL – 10 mL	dengan air destilasi (20 nmol mL ⁻¹), 0,05 mL sampel untuk analisis = 1.00 μmol

Catatan : sertakan selalu 0,05 mL air destilasi kosong dengan standar selama analisis.

4.3.4.2. Prosedur

- (a) Tempatkan 0,05 mL sampel eksudat silem atau ekstrak saringan air panas dalam tiap tabung test (untuk persiapan kurva standar nitrat gunakan 0,05 mL dari setiap standar nitrat dan ulangi 0,05 mL air kosong)
- (b) Tambah 0,2 mL 5% asam salisiklik dan campurkan
- (c) Tempatkan pada suhu kamar selama 20 menit, kemudian tambah 4,75 mL 2M NaOH (untuk meningkatkan pH sampai > 12)
- (d) Dinginkan sampai suhu kamar dan baca pada spektrofotometer kepadatan optimal (*absorbance*) pada 410 nm
- (e) Kandungan nitrat sampel ditentukan dari kurva standar nitrat yang disiapkan (1 μ mol standar diberikan pada pembacaan kepadatan optikal sekitar 1,2), dan faktor koreksi yang digunakan ($1,0 \cdot 0,05^{-1} = x \cdot 20$) untuk merubah sampel dari μ mol ke dalam μ mol l⁻¹

4.4. Kurva kalibrasi

Hubungan kuantitatif antara komposisi larutan N dalam eksudat silem dan proporsional tanaman tergantung pada fiksasi N₂ dapat disiapkan di dalam rumah kaca dengan menanam sejumlah leguminosa yang diinokulasi dalam pot yang mengandung media akar bebas N (seperti pasir sungai bebas bahan organik, atau campuran 1 : 1 pasir : vermikulit). Tanaman yang berhasil diinokulasi sepanjang pertumbuhannya disuplai dengan larutan nutrisi lengkap bebas N atau larutan nutrisi yang disuplementasi dengan satu dari beberapa konsentrasi mineral N (seperti dijelaskan oleh Gibson (1980) atau Herridge (1984). Kesimpulan dari beberapa tanaman dengan sumber N untuk pertumbuhan turun secara cepat dari ketergantungannya terhadap N₂ udara (tanaman yang diberi makanan larutan nutrisi bebas N) sampai hampir keseluruhannya tergantung pada N mineral (kadar N an organik tinggi seperti digambarkan pada Gambar 4.3.). Eksudat silem dikoleksi dari tanaman-tanaman atau ekstrak jaringan material batang yang dipanen dianalisis untuk komposisi larutan N. Tanaman yang tergantung pada fiksasi N atau penyerapan N oleh akar pada setiap level N mineral dapat diduga dengan beberapa prosedur seperti larutan isotop ¹⁵N (dengan penambahan N an organik yang diperkaya dengan ¹⁵N); hubungan antara komposisi larutan N dan fiksasi N₂ kemudian dipersiapkan.

Dikarenakan kepentingannya dalam kebanyakan sistem pertanian nitrat selalu digunakan untuk menghasilkan perbedaan derajat ketergantungan leguminosa terhadap fiksasi N₂ pada setiap pengujian dalam penelitian. Bagaimanapun ammonium dipertimbangkan sebagai leguminosa pengirim

ureida (Peoples *dkk.* 1989) dan amida (M.N. Sudin dan M.B. Peoples, data tidak dipublikasikan). Studi tersebut mengindikasikan bahwa keakuratan penghitungan fiksasi N₂ tidak akan dipengaruhi oleh penggunaan kurva kalibrasi berasal dari nitrat pada species penghasil ureida dan sedikit akan dipengaruhi penghasil amida yang menyediakan kurang dari 50% N yang diserap oleh akar dalam bentuk ammonium.

4.4.1. Pengirim ureida

Metoda ureida, menggunakan eksudat akar, ekstrak dari bagian-bagian tanaman dan eksudat yang diekstrak secara vakum telah digunakan pada studi lapang selama beberapa tahun untuk menduga fiksasi nitrogen (terutama pada kedelai). Pada kebanyakan penelitian, teknik telah menyediakan indeks aktivitas fiksasi daripada estimasi kuantitatif dari N terfiksasi (seperti Neves *dkk.* 1985; Patterson dan La Rue 1983; Thomas *dkk.* 1984; Van Berkum *dkk.* 1985). Bagaimanapun, estimasi fiksasi musiman telah dibuat dengan menggunakan kurva kalibrasi yang disiapkan di rumah kaca, terdapat pengertian yang layak antara determinasi yang berasal dari ureida dan estimasi dengan menggunakan prosedur perbedaan-N dan ¹⁵N (seperti Herridge *dkk.* 1984; Rerkasem *dkk.* 1988).

Konsentrasi absolut larutan dengan silem dan ekstrak batang ditentukan oleh status air tanaman dan berhubungan dengan laju transpirasi. Sebagai konsekuensi, konsentrasi senyawa N secara individu sangat bervariasi dari tanaman ke tanaman. Untuk alasan ini, kandungan ureida sampel lebih akurat diekspresikan dalam bentuk perbandingan relatif nilai atau rasio, daripada sebagai molaritas komponen tunggal. Oleh karena itu indeks ureida relatif digunakan untuk mengukur proporsi getah silem total atau ekstrak N dalam bentuk allantoin atau asam allantoin, saat kandungan ureida berhubungan dengan ketergantungan simbiosis pada kurva kalibrasi :

$$\text{Indek relatif ureida (\%)} = \frac{\text{N ureida} \times 100}{\text{Getah N total}}$$

Karena satu molekul ureida mengandung 4 atom N, ureida N dikalkulasi sebagai 4x konsentrasi molar ureida. Getah N total diestimasi sebagai konsentrasi molar (4x ureida + asam amino + nitrat) ditentukan dengan analisis kolorimetrik (Seksi 4.3.1.).

Indek relatif ureida dapat dikalkulasi sebagai :

$$\text{Indek relatif ureida (\%)} = \frac{\text{N ureida}}{(4x \text{ ureida} + \text{asam amino} + \text{nitrat})} \times 100$$

Untuk ekstrak sumbu tajuk :

Amino-N tidak dihitung. Oleh karena itu :

$$\text{Indek relatif ureida (\%)} = \frac{\text{N ureida}}{(4x \text{ ureida} + \text{nitrat})} \times 100$$

Penelitian kalibrasi indek relatif ureida terhadap estimasi ^{15}N dari fiksasi N_2 telah dilakukan pada kedelai, Cowpea (Pate *dkk.* 1980), Rice bean (Rerkasem *dkk.* 1988), dan kacang gude (Peoples *dkk.* 1989). Penelitian pendahuluan membandingkan berbagai species leguminosa (kedelai, gram hijau, gram hitam, cowpea, kacang gude dan kacang navy) mengindikasikan bahwa perbedaan dalam hubungan dengan ureida antar species kemungkinan kecil. Oleh karena itu hanya fungsi-fungsi kalibrasi disiapkan untuk kedelai dijelaskan di bawah. Pada dasarnya, bagaimanapun, penelitian-penelitian kalibrasi seharusnya diselesaikan untuk setiap species sebelum teknik ureida dapat digunakan untuk mengukur fiksasi N_2 dengan penuh kepercayaan.

Pada kedelai dan kacang gude (Peoples *dkk.* 1989) terdapat pengaruh usia tanaman pada komposisi larutan N dapat dilihat menyimpulkan dua set kalibrasi; pertama pada tanaman fase vegetatif dan pembungaan (fase V-R2 berdasarkan pada skema perkembangan dari Fehr *dkk.* 1971), lainnya pada tanaman fase pengisian polongan (R3-R7).

Hubungan antara ureida relatif dan tanaman yang tergantung pada fiksasi N_2 muncul tidak dipengaruhi oleh kultivar/genotipe atau strain rhizobium. Oleh karena itu, nilai-nilai berikut selamanya sesuai untuk kombinasi kultivar/strain kedelai (Tabel 4.2.).

4.4.1.1. Pengeluaran eksudat akar

Diskripsi fungsi hubungan antara P (proporsi N tanaman yang diperoleh dari fiksasi N_2) dan kelimpahan relatif ureida dalam eksudat akar (x) adalah :

$$P = 1,2 (x-4,8) \text{ untuk tanaman fase vegetatif dan pembungaan}$$

$$P = 1,5 (x-21,3) \text{ untuk tanaman selama pengisian polongan}$$

Catatan: konsentrasi larutan silem tidak harus digandakan dengan laju pengeluaran dari ujung akar (ditentukan oleh volume getah yang dikoleksi melebihi waktu) untuk mengkalkulasi laju translokasi (seperti Neves *dkk.* 1985) dan Thomas *dkk.* (1984). Perubahan N dalam eksudat silem tidak menyediakan estimasi kuantitatif dari N yang dipindahkan dari akar ke tajuk tanaman yang masih lengkap (Rufty *dkk.* 1982) dan mungkin hanya longgar berhubungan dengan translokasi (M.B. Peoples, data tidak dipublikasikan).

Tabel 4.2. Kelimpahan relatif ureida dalam getah akar dan eksudat ekstraksi vakum dan ekstrak sumbu tajuk kedelai untuk berbagai nilai P^a . Semua nilai dalam (%)

Proporsi N tanaman fiksasi N_2 (P)	Eksudat getah akar		Eksudat yang diekstrak vakum		Ekstark dari batang akses	
	Veg., fl ^b	Pod-fill ^c	Veg., fl	Pod-fill	Veg., fl	Pod-fill
0	5	21	8	16	1	11
5	9	25	11	19	3	13
10	13	28	14	22	5	16
15	17	31	17	25	7	19
20	21	35	20	29	10	22
25	26	38	24	32	13	25
30	30	41	27	35	16	29
35	34	45	30	38	19	33
40	38	48	33	41	23	36
45	42	51	36	45	27	40
50	46	55	40	48	31	44
55	50	58	43	51	36	49
60	54	62	46	54	41	53
65	59	65	49	57	46	58
70	63	68	52	61	51	63
75	67	72	56	64	57	68
80	71	75	59	67	63	73
85	75	78	62	70	69	78
90	79	82	65	73	76	84
95	83	85	68	76	82	89
100	88	88	72	79	90	95

^a Didapatkan dari data eksperimen

^b Perkembangan fase vegetatif dan pembungaan sampai R2 berdasarkan pada Fehr *dkk.* (1971)

^c Perkembangan fase reproduksi setelah R2

4.4.1.2. Eksudat ekstraksi vakum

Diskripsi fungsi dari hubungan antara P (proporsi N tanaman yang didapatkan dari fiksasi N_2) dan kelimpahan relatif ureida pada eksudat ekskresi vakum (x) adalah :

$$P = 1,6 (x-7,7) \text{ untuk tanaman fase vegetatif dan pembungaan}$$

$$P = 1,6 (x-15,9) \text{ untuk tanaman selama pengisian polongan}$$

4.4.1.3. Ekstrak dari sumbu tajuk (batang dan petiol)

Ekstrak jaringan mungkin sangat sesuai untuk tanaman-tanaman vegetatif muda. Untuk tanaman-tanaman yang lebih besar, mengkoleksi eksudat silem lebih tepat (atau ekstraksi vakum atau pendarahan akar).

$X = 1,4 + 0,31 P + 0,0057 P^2$ untuk tanaman fase vegetatif dan pembungaan

$X = 10,7 + 0,50 P + 0,0034 P^2$ untuk tanaman selama pengisian polongan

Dimana P = proporsi N tanaman dari fiksasi N_2 , dan X = kelimpahan ureida pada ekstrak sumbu tajuk.

4.4.2. Pengirim Amida

Perkembangan kurva kalibrasi untuk leguminosa pengirim amida mengandalkan pada kandungan nitrat silem sebagai indek perubahan ketergantungan simbiosis. Studi di rumah kaca mengindikasikan bahwa prosedur larutan N mungkin dapat dipakai untuk kacang tanah, *chickpea*, *lentil* dan *pea* (Peoples *dkk.* 1986; 1987) dan *lupin* (hanya ekstrak jaringan; Herridge 1988). Bagaimanapun, Hansen (1987) memberi kesan bahwa teknik mungkin tidak sesuai untuk *Acacia spp.* yang ditemukan di hutan Australia Barat atau terdapat kemunculan perubahan yang cukup dari komposisi silem pada *faba bean* untuk membiarkan persiapan hubungan antara larutan N dan fiksasi N_2 yang dapat diandalkan (People *dkk.* 1987).

Potensi di lapang dari metoda analisis larutan N pada non-ureida leguminosa pangan selama ini telah dievaluasi hanya pada lupin dan kacang tanah. Padahal memberikan estimasi fiksasi N_2 yang mirip dengan metoda lain (Herridge dan Doyle 1988). Studi pada kacang tanah (Norhayati *dkk.* 1988) menunjukkan bahwa ketergantungan simbiosis dapat diperoleh dari kurva kalibrasi yang digambarkan pada Gambar 4.4b. saat nitrat digunakan sebagai indikator dari penggunaan N, atau ketika asparagine digunakan sebagai indikator aktivitas bintil akar; bagaimanapun, keakuratan setiap estimasi masih harus diuji keabsahannya oleh teknik lain.

Sejak hubungan larutan N dengan fiksasi N_2 menjadi sangat spesifik dalam pengiriman amida, sebagai contoh pembaca ditunjukkan ke Peoples *dkk.* (1987) dan Herridge (1988).

4.5. Evaluasi data analitis dan estimasi fiksasi N₂

Pada bagian ini, data penelitian lapang akan digunakan untuk mengukur pengaruh dua perlakuan (dalam hal ini pengolahan lahan) terhadap fiksasi N₂ oleh kedelai.

Protokol pengambilan sampel bahan kering tanaman didiskusikan pada bagian 3.1.1. Nilai N total tanaman pada Gambar 4.7. memakai 4 ulangan, setiap ulangan meliputi sampel dari 15 tanaman yang diambil secara acak dari plot ulangan (Tabel 4.3.). Oleh karena itu setiap estimasi N tanaman pada Gambar 4.7. meliputi pengambilan sampel dari 60 tanaman (4 ulangan dari 15 tanaman). Ini sebaiknya dianggap sebagai jumlah minimum (untuk jelasnya lebih lanjut lihat Hunt *dkk.* 1987). Nilai kelimpahan relatif ureida dalam ekstrak sumbu tajuk dan eksudat silem (Gambar 4.8.) juga memakai 4 ulangan, dalam hal ini mencakup 10 tanaman yang diambil secara acak dari *plot* ulangan. Untuk amannya jumlah total tanaman yang diambil dari plot, dengan demikian meminimalkan pengaruh kompetisi, gunakan 10 sampel 10 tanaman untuk ekstraksi eksudat silem dapat merupakan bagian dari 15 sampel tanaman yang diperlukan untuk estimasi bahan kering tanaman dan N dengan sederhana, potong penguat eksudat sekali setelah diekstraksi (lihat bagian 4.2.3.2.). Karena jumlah pengambilan sampel adalah besar (7 ditambah pengambilan sampel akhir untuk biji), ukuran plot seharusnya juga besar yaitu sekitar 20 m jajaran/ baris dari tanaman yang siap panen; di daerah penyangga mungkin ditambahkan untuk ini.

Tabel 4.3. N tanaman (kg ha⁻¹) untuk 4 plot ulangan dari dua perlakuan pengolahan tanah pada tiap waktu pengambilan sampel. N tanaman dikalkulasi sebagai :

$$[(\text{berat tajuk} \times \%N \text{ tajuk}) 100^{-1} + (\text{berat akar} \times \%N \text{ akar}) 100^{-1}] \times \text{jumlah tanaman ha}^{-1} \times 10^{-3} \text{ (dimana berat tajuk dan akar dalam g tanaman}^{-1}\text{)}$$

Fase fisiologis ^a	Hari setelah tanam ^b	Dikultivasi					Tanpa pengolahan				
		Ulangan					Ulangan				
		1	2	3	4	rerata	1	2	3	4	rerata
V6	30	9,6	10,8	14,2	14,6	12,3	8,6	7,9	12,6	9,8	9,7
R1	45	41,5	38,6	48,7	41,8	42,7	29,8	34,5	28,4	35,8	32,1
R2	53	76,9	74,1	85,7	72,8	77,4	58,9	64,1	65,2	58,1	61,6
R4	65	125	148	136	158	141,8	115	139	142	137	133,3
R5	72	167	181	175	169	173,0	164	171	183	157	168,8
R6	83	202	196	215	242	213,8	223	218	231	199	217,8
R7	98	213	219	202	229	215,8	241	202	228	215	221,5

^a berdasarkan pada skema Fehr *dkk.* (1971).

^a Catatan : umur pengambilan sampel ditunjukkan disini seharusnya digunakan hanya sebagai petunjuk. Waktu panen yang sebenarnya dari N tanaman dan ureida seharusnya ditentukan oleh perkembangan fase-fase fisiologis, dan pola karakteristik leguminosa test dari akumulasi N dan laju kematangan pada lingkungan yang khusus.

Tabel 4.4. Kalkulasi estimasi fiksasi N₂ oleh tanaman kedelai yang dikultivasi

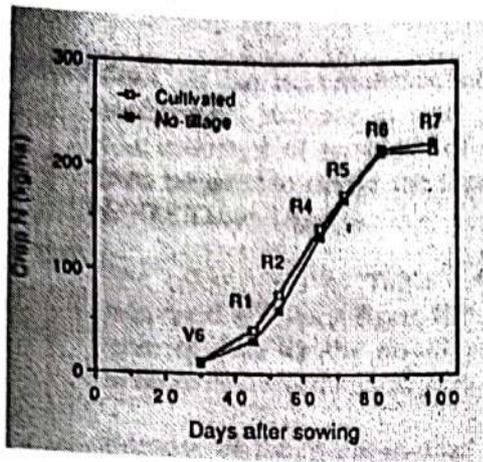
Hari setelah tanam	N tanaman		N tanaman dari fiksasi N ₂		
	Kumulatif ^a (kg ha ⁻¹)	Penambahan	Proporsi ^c (%)	Penambahan ^d (kg ha ⁻¹)	Kumulatif
0	3 ^b				
30	12,3	9,3	6	0,5	0,5
45	42,7	30,4	22	6,7	7,2
53	77,4	34,7	35	12,1	19,3
65	141,8	64,4	48	30,9	50,2
72	173,0	31,2	59	18,4	68,6
83	213,8	40,8	77	31,4	100,0
98	215,8	2,0	85	1,7	101,7
Total	215,8	215,8			101,7

^a dari Tabel 4.3.

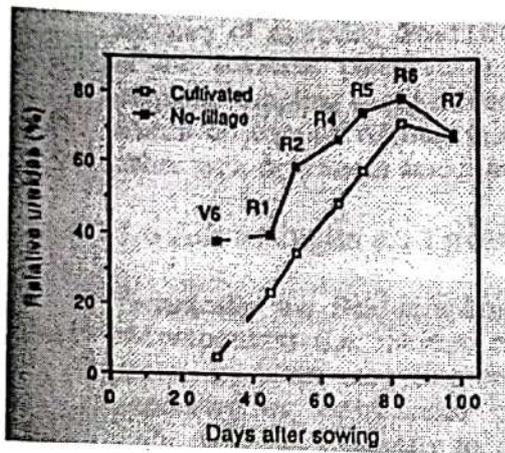
^b N benih

^c dari Gambar 4.9.

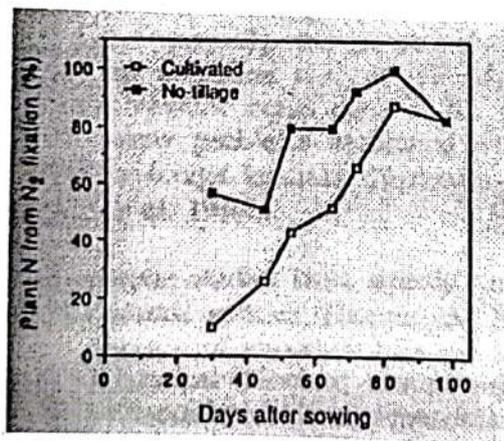
^d (kolom 3 x kolom 4) 100⁻¹



Gambar 4.7. Akumulasi N tanaman, tajuk dan akar di sampel untuk menentukan N tanaman. Fase pertumbuhan tanaman (V6-R7) ditunjukkan dan dihubungkan dengan waktu pengambilan sampel (untuk deskripsi fosil-fosil perkembangan tanaman, lihat Fehr *dkk.* 1971).



Gambar 4.8. Perubahan kelimpahan relatif ureida dalam ekstrak sumbu tajuk dari kedelai dengan waktu. Setiap titik memakai 4 ulangan, setiap ulangan mencakup 10 sampel tanaman.



Gambar 4.9. Perubahan proporsi tanaman yang didapat dari fiksasi N₂ ditentukan dari kurva kalibrasi ureida terhadap waktu.

Perlakuan untuk N tanaman dapat digambarkan dalam bentuk grafik (Gambar 4.7.). Pada pengambilan sampel pertama eksudat silem tidak dapat dikoleksi baik dari eksudat getah akar atau ekstraksi vakum dari tanaman-tanaman kecil. Oleh karena itu, sumbu tajuk (batang dan petiol) di sampling dan dibuat ekstrak air panas (lihat bagian 4.2.2.). Eksudat silem diekstraksi vakum dari tanaman setelah pengambilan sampel (yaitu R1 dan R7). Data dipresentasikan dalam bentuk grafik pada Gambar 4.8.

Data untuk ureida relatif ini sekarang dicocokkan dengan tabel kalibrasi (Tabel 4.2.) untuk menentukan proporsi N tanaman yang diperoleh dari fiksasi N untuk setiap dua perlakuan kultivasi pada setiap waktu pengambilan sampel (Gambar 4.9). Data akumulasi N tanaman (Tabel 4.3.) digunakan untuk mengkalkulasi pertambahan kenaikan N total tanaman antar panen (misalnya kolom 3, Tabel 4.4.). Estimasi ketergantungan simbiosis ditunjukkan pada Gambar 4.9. (kolom 4, Tabel 4.4.) kemudian biasanya menerima input fiksasi N antar pengambilan sampel (kolom 3 x kolom 4 100^{-1} , Tabel 4.4.).

Kalkulasi pada Tabel 4.4. mengindikasikan bahwa kedelai kultivasi menfiksasi 102 kg N ha^{-1} (kolom 6) atau 47% dari N total tanaman, setelah massa pertumbuhan. Sebuah tabel data yang mirip, untuk perlakuan tanpa kultivasi yang diestimasi musiman menfiksasi 175 kg N ha^{-1} , ini sama dengan 79% N total tanaman.

Dikarenakan "point-in-time" alami dari estimasi fiksasi N_2 yang diperoleh dari ureida, intensitas pengambilan sampel yang dijelaskan di atas adalah perlu untuk menyediakan perhitungan yang akurat dari kontribusi musiman fiksasi N_2 ke hasil N leguminosa. Namun demikian, frekuensi pengambilan sampel yang kurang dapat digunakan untuk tujuan perbandingan saat pendugaan efek perlakuan terhadap ketergantungan leguminosa pada fiksasi N_2 . Setiap perbandingan dapat dilakukan dengan atau tanpa penggabungan perhitungan N tanaman.

4.6. Keuntungan dan kemungkinan penggunaan metoda larutan N

Secara teknik pengambilan sampel kandungan silem di lapang adalah sederhana, dan analisis komponen N (yaitu ureida, N-alpha-amino dan nitrat) dapat dilakukan dengan rangkaian kolorimeter dalam tabung test (lihat bagian 4.3.). Konsekuensinya tidak memerlukan peralatan yang mahal atau canggih, dan beberapa analisis dapat dilakukan setiap hari. Untuk mendapatkan hasil akar untuk menghitung fiksasi N_2 tidak perlu menggali akar leguminosa dan juga tidak perlu merusak teknik secara total seperti getah secara lengkap untuk analisis dapat dikoleksi secara cukup dari bagian batang dan cabang-cabang tanaman dewasa (Herridge *dkk.* 1988). Karena pengambilan sampel dibatasi untuk mendapatkan bagian atas tanaman metoda larutan kemungkinan dapat menanggulangi banyak problem yang berhubungan dengan perhitungan fiksasi nitrogen oleh leguminosa penutup tanah atau leguminosa tanaman pakan (Norhayati *dkk.* 1988), atau leguminosa tanaman berkayu (Peoples *dkk.* 1988b).

Beberapa studi telah menguji bentuk N yang ditransportasi di dalam silem dari species tanaman berkayu (Hansen dan Pate 1987; Van Kessel *dkk.* 1988). Sebuah survey besar tentang pohon dan leguminosa semak penting saat ini berlangsung untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa larutan N utama yang berada dalam silem tanaman penfiksasi nitrogen dan tanaman non-penfiksasi nitrogen yang tergantung pada nitrat (D.F. Herridge, T. Ibrahim, D.P. Norhayati, B. Palmer, M.B. Peoples, data tidak dipublikasi). Sekali senyawa-senyawa ini secara jelas telah diidentifikasi hubungan antara komposisi silem dan tanaman yang tergantung pada simbiotik yang akan dikalibrasi dan metoda larutan N sesuai untuk digunakan pada penelitian-penelitian lapang dengan pohon penfiksasi N_2 .

4.7. Pembatas potensial

Terlepas dari perbedaan species dalam bentuk N transport, pengaruh variasi prosedur pengambilan sampel, fisiologis, lingkungan dan nutrisi seharusnya dipertimbangkan sebelum hubungan yang didapat di rumah kaca dapat disahkan penggunaannya pada tanaman-tanaman yang ditanam di lapang. Faktor-faktor bervariasi yang perlu dipertimbangkan ketika penggunaan teknik telah diidentifikasi (Tabel 4.5.). Sumber-sumber kesalahan didaftar muncul sangat serius, jika waktu antara pemanenan tajuk dan ekstraksi kandungan silem vakum. Namun demikian, waktu yang berhubungan dengan perubahan-perubahan dalam larutan N dapat dihindari dengan ekstraksi getah vakum dalam waktu 5 menit dari pemotongan batang (Herridge *dkk.* 1988; Peoples *dkk.* 1989).

Ketidakuntungan utama dari teknik larutan N adalah bahwa teknik menyediakan waktu pendek daripada gabungan waktu yang diperlukan untuk penghitungan dari ketergantungan simbiosis. Jika estimasi fiksasi musiman diperlukan daripada perhitungan komparatif pengaruh perlakuan terhadap fiksasi N_2 , perhitungan ulangan harus menggabungkan pengambilan sampel yang berurutan dari produksi bahan kering dan kandungan N total tanaman (bagian 4.5.).

Tabel 4.5. Pembatas-pembatas potensial pada penggunaan teknik larutan N silem untuk mengevaluasi fiksasi N₂ oleh leguminosa di lapang

Variabel	Komentar
Species tanaman	Senyawa-senyawa N penting yang ditransportasi dari bintil akar merupakan sifat dari species. Hubungan antara larutan N dan fiksasi N ₂ sering mirip pada pengirim ureida, tetapi dalam teori sebaiknya jangan menggunakan getah silem atau analisis ekstrak untuk perbandingan khusus tanpa pengkalibrasian dahulu pada setiap species. Hubungan bervariasi antara leguminosa pengirim amida. Metoda mungkin tidak sesuai untuk beberapa species. Metoda adalah perhitungan tidak langsung - hubungan antara komposisi silem dan keberadaan fiksasi N ₂ harus establis.
Kultivar/ genotype	Muncul tidak jelas, meskipun perbedaan lokasi nitrat reduktase mungkin penting pada penghasil amida.
Strain rhizobium	Laporan-laporan yang berlawanan tentang pengaruh strain rhizobium terhadap komposisi silem, memerlukan pengujian lebih lanjut. Arti estimasi fiksasi N ₂ masih akan dievaluasi, tetapi kemungkinannya kecil.
Umur tanaman	Sedikit pengaruh dengan species yang tidak menentukan, mungkin memerlukan beberapa kalibrasi untuk mencakup seluruh fase-fase pertumbuhan pada beberapa leguminosa, seperti kedelai dan kacang gude.
Tekanan N dan pelapukan	Hubungan larutan N tidak berlaku pada kekurangan N dan kematian tanaman (konsentrasi larutan total silem kurang dari 1-2 μmol mL ⁻¹). Oleh karena itu koleksi getah harus diambil bersama dengan panen periodik untuk N total panen, tekanan berat akan lebih nyata.
Sumber N tanah	Rupanya tidak jelas pada pengirim ureida. Pengaruh penting pada komposisi silem hanya jika ammonium merupakan bentuk utama dari N mineral yang diserap oleh akar yaitu > 50%.
Koleksi sampel silem dengan vakum	Kandungan larutan relatif tetap antara jam 9 pagi sampai 4 sore dan tidak dipengaruhi oleh sumber atau kekuatan vakum. Kenaikan pemisahan tajuk dari akar dan ekstraksi vakum dari silem batang. Sumber kesalahan potensial jika direkomendasikan pengambilan sampel protokol tidak diikuti.
Penyimpanan sampel silem	Stabilkan selama 4 jam pada 25-30°C. Stabilkan pada 50% ethanol selama 14 hari. Lebih disukai untuk dijaga dalam dingin sampai ditempatkan pada freezer.

5

TEKNIK PERBEDAAN NITROGEN

5.1. Prinsip di belakang metoda

Estimasi fiksasi N_2 di lapangan yang paling sederhana didapatkan dengan penghitungan jumlah total N pada tanaman leguminosa telah dilaporkan dalam kepustakaan. Setiap determinasi didasarkan pada asumsi yang berubah-ubah bahwa tanaman-tanaman ini mendapatkan semua N mereka dari fiksasi nitrogen. Saran ini tidak realitis dan tidak mendukung dan nilai yang dikalkulasi hanya berdasarkan dari hasil N leguminosa hampir selalu melebihi fiksasi. Perhitungan fiksasi yang benar berdasarkan pada akumulasi N tanaman mungkin didapatkan hanya jika kontribusi N tanah terhadap N total leguminosa diketahui. Ini mungkin diestimasi dengan penanaman tanaman kontrol non-penfiksasi N_2 pada tanah yang sama dan dalam kondisi yang sama seperti pada leguminosa (biasanya berdampingan dalam *plot*). Berdasarkan perbedaan pada akumulasi N total tajuk per tanaman atau per unit area antara leguminosa dan tanaman kontrol yang kemudian secara umum dianggap sebagai kontribusi fiksasi simbiosis terhadap leguminosa.

5.2. Aplikasi, Keuntungan, Pembatas

Metoda perbedaan-N adalah prosedur yang relatif sederhana. Dasar asumsi adalah bahwa baik leguminosa dan kontrol mengandung jumlah N yang didapat dari tanah yang sama di dalam tajuknya. Untuk itu akan menjadi sah jika 2 tipe tanaman harus menjelajahi daerah perakaran di dalam tanah yang sama, memiliki kesamaan kemampuan untuk mengekstraksi N_2 dan mengakumulasi N tanah pada periode waktu yang sama (hal ini terutama sekali penting jika beberapa estimasi fiksasi nitrogen diinginkan selama masa pertumbuhan). Distribusi N antara bagian atas dan akar dari 2 tipe tanaman juga harus sama. Tanaman kontrol non-penfiksasi nitrogen mungkin :

- (i) Bukan leguminosa
- (ii) Leguminosa sesama species yang tidak diinokulasi (memerlukan tanahtanpa rhizobium *spp.* efektif)
- (iii) Leguminosa genotipe tidak berbintil akar

Sayangnya, perbedaan antara tanaman-tanaman penfiksasi dan non-penfiksasi pada kapasitas mereka untuk menggunakan N sering terjadi, dan syarat dasar bahwa terdapat penggunaan pemakaian N tanah yang sama oleh leguminosa dan kontrol tidak selalu mudah untuk dicapai. Meskipun tanaman kontrol yang digunakan diduga *ideal* (berdasarkan uji *isoline* bukan merupakan leguminosa tidak berbintil akar), kesimpulan mungkin tidak benar dikarenakan perbedaan morfologi akar (misalnya Boddey *dkk.* 1984).

Pentingnya pemilihan tanaman kontrol terutama berdasarkan pada derajat N tanah yang sesuai untuk tanaman. Jika derajat kandungan N tanah rendah dan tanaman-tanaman kontrol mengakumulasi N yang lebih rendah daripada tanaman test leguminosa, kesalahan dikarenakan tipe tanaman mungkin minimal.

5.3. Metodologi

5.3.1. Analisis leguminosa dan tanaman kontrol nitrogen bukan penfiksasi N₂

Pengambilan sampel material tanaman yang tepat (dan untuk N mineral) dan berikutnya analisis *Khejdahl* dijelaskan pada bagian 3. Jika lebih dari satu estimasi N₂ diperlukan selama satu musim, ukuran *plot* baik untuk leguminosa dan kontrol harus dibiarkan cukup untuk tanaman dipanen untuk menyediakan estimasi N tanaman dapat diandalkan (lihat Hunt *dkk.* 1987; bagian 3.1.1.).

Areal yang sama dari *plot* leguminosa dan kontrol akan dipanen dan penelitian akan disiapkan dalam rancangan acak kelompok dengan paling sedikit 4 ulangan (tergantung dari keseragaman tanah). Rancangan *plot* didiskusikan lebih lanjut pada bagian 6.3.3.

5.3.2. Evaluasi data analitis dan estimasi fiksasi N₂

Beberapa variasi eksis pada metoda perbedaan-N. Pada umumnya jumlah N leguminosa yang diperoleh dari fiksasi N₂ (Q) dikalkulasi sebagai :

$$Q = \text{hasil N (leguminosa)} - \text{hasil N (kontrol)} \quad (\text{A})$$

Namun demikian, sebuah modifikasi prosedur telah disamakan ditujukan untuk memperbaiki akurasi perhitungan saat leguminosa dan kontrol tidak padu dengan baik (Evan dan Taylor, 1987). Pada metoda ini perbedaan N

mineral tanah setelah panen pada *plot* penfiksasi dan bukan penfiksasi juga ditentukan dan ditambahkan ke perbedaan hasil N total dari kedua tanaman. Jadi rumusnya (A) menjadi :

$$Q = \frac{[\text{hasil N (leguminosa)} - \text{hasil N (kontrol)}]}{[\text{N tanah (leguminosa)} - \text{N tanah (kontrol)}]} + [\text{N tanah (B)}]$$

Penggunaan ekspresi kedua ini mengasumsikan bahwa mineralisasi, pelarutan hara dan denitrifikasi adalah sama pada setiap tanaman. Kesahihan dari asumsi ini harus sudah didemonstrasikan pada kondisi lapangan.

Contoh penggunaan data lapangan untuk mengkalkulasi fiksasi N₂ dengan metoda perbedaan-N dipresentasikan pada Tabel 5.1. Pada contoh ini pemilihan dari species tanaman bukan penfiksasi N₂ (gandum dan *linseed*) sebagai tanaman kontrol untuk lupin sangat mempengaruhi estimasi fiksasi N₂ yang didapatkan. Pencantuman derajat N mineral tanah sampai kedalaman 20 cm setelah panen pada rumus (B) tidak sangat merubah perbedaan antara kedua tanaman kontrol (keakuratan mungkin telah diperbaiki dengan penghitungan N mineral tanah sampai kedalaman 100 m; Evan dan Taylor 1987). Namun demikian, perbandingan jumlah N yang berakumulasi pada kedua species kontrol (Tabel 5.1.) memberikan kesan bahwa pertumbuhan *linseed* dibatasi oleh faktor-faktor lain kecuali N, dalam hal ini mengindikasikan bahwa gandum adalah lebih cocok sebagai kontrol. Untuk menghindari penggunaan kontrol yang tidak sesuai diperlukan sekali untuk memasukan dan membandingkan sebuah species kontrol yang berbeda dalam penelitian dimana hasil N tanaman digunakan untuk mengkalkulasi N leguminosa input dari fiksasi N₂.

Tabel 5.1. Kandungan N tajuk *lupin* dan dua tanaman kontrol bukan penfiksasi nitrogen (gandum dan *linseed*), derajat N mineral tanah setelah panen, dan estimasi fiksasi N₂ dengan teknik perbedaan-N (kg N ha⁻¹)^a

Species	N tanaman	N mineral setelah panen ^b	Q ^c	Estimasi fiksasi N ₂ Q modifikasi ^d
<i>Lupin</i>	192	30	73 (G) 125 (L)	85 131
Gandum (G)	119	18	-	-
<i>Linseed</i> (L)	67	24	-	-

^a didapat dari data Evan *dkk.* (1987). *Lupin* dan species kontrol ditanam sehingga plot *lupin* diapit oleh gandum dan *linseed*. Setiap *plot* dengan panjang 8 m mengandung 24 baris, dengan jarak 18 cm. Data N tanaman menggambarkan rata-rata dari 0,25 m² dari setiap 4 ulangan termasuk daun-daun yang jatuh.

^b diambil pada kedalaman 0-20 m. Kalkulasi berdasarkan konsentrasi NO₃⁻ dan NH₄⁺ dalam *ppm*, dan diatur oleh kepadatan tanah dan pemotongan areal setempat dari *core* tanah yang biasa untuk mengkoleksi sampel tanah.

^c Kalkulasi dari rumus (A), menggunakan gandum (G) atau *linseed* (L) sebagai kontrol bukan penfiksai N₂

^d Kalkulasi dari rumus (B), menggunakan gandum (G) atau *linseed* (L) sebagai kontrol bukan penfiksai N₂

6

BERBAGAI TEKNIK ISOTOP ^{15}N

6.1. Prinsip dari Metoda

Terdapat 2 isotop stabil nitrogen, ^{14}N dan ^{15}N . Isotop berat ^{15}N terdapat pada N_2 atmosfer pada kelimpahan tetap 0,3663 atom % (total variasi dengan rentangan dari 0,36628 – 0,36632; Mariotti *dkk.* 1983). Jika kelimpahan ^{15}N pada N tanah yang tersedia bagi tanaman lebih tinggi dari ini, estimasi dari proporsi N leguminosa yang diperoleh dari setiap sumber dapat ditentukan. Untuk estimasi ini, kelimpahan ^{15}N pada N tanah yang tersedia bagi tanaman diperoleh dengan menganalisis tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 yang secara total bergantung pada N tanah untuk pertumbuhan (Gambar 6.1.).

Dengan peningkatan fiksasi N_2 , kelimpahan ^{15}N pada tanaman penfiksasi N_2 menurun sebanding dengan nitrogen yang diasimilasikan dari tanah dilarutkan oleh N_2 atmosfer yang mengandung kelimpahan ^{15}N rendah pada bintil akarnya (Gambar 6.1.). Jumlah fiksasi N_2 dikalkulasi dari ekspresi aljabar sederhana (8, 9 pada bagian 6.3.6.). Asumsi sebenarnya dari metoda adalah :

- (i) rasio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dari tanaman referensi bukan penfiksasi nitrogen adalah sama seperti di dalam tanah.
- (ii) leguminosa dan tanaman referensi menjelajah pool N tanah dengan komposisi $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ yang sama.

Pada beberapa kasus perbedaan yang sangat kecil dari kelimpahan ^{15}N antara N tanah dan N_2 dapat digunakan, secara tepat sesuai dengan mass spektrometer yang tersedia. Biasanya, perbedaan antara N tanah dan N_2 ditingkatkan dengan penggabungan senyawa nitrogen yang diperkaya ^{15}N di dalam tanah (misalnya antara 5 sampai 95 atom % ^{15}N).

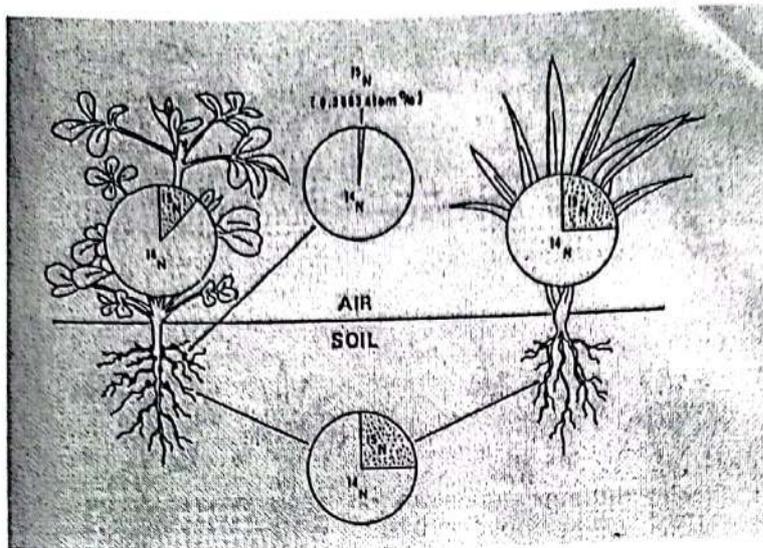
6.2. Aplikasi, Keuntungan dan Keterbatasan

6.2.1. Pengkayaan ^{15}N

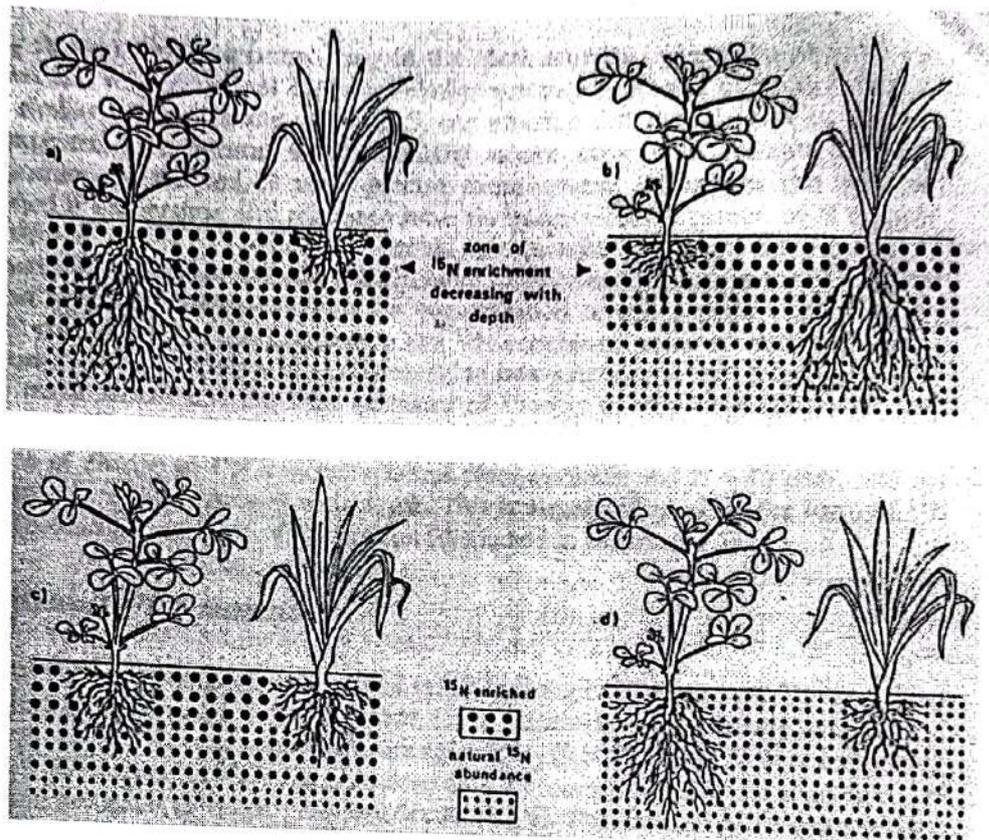
Penggunaan metoda-metoda mencakup penyesuaian buatan dari tanah yang diperkaya ^{15}N untuk menghitung fiksasi N telah dibahas secara luas (misal, Chalk 1985; Danso 1988; Hanck dan Weaver 1986; Ledgard dan Peoples 1988; Wittey *dkk.* 1988). Asumsi utama adalah bahwa tanaman leguminosa dan tanaman referensi menyerap jumlah N relatif sama dari penambahan ^{15}N dan N tanah. Keuntungan utama adalah bahwa metoda menyediakan rata-rata waktu estimasi proporsi (P) dari N leguminosa yang didapatkan dari fiksasi N secara menyeluruh dari setiap perubahan P yang mungkin terjadi selama penghitungan pool. Estimasi P adalah tidak tergantung dari perhitungan hasil, meskipun perlu untuk menghitung bahan kering dan hasil N untuk menentukan jumlah fiksasi N.

Lepas dari biaya peralatan yang tinggi untuk menghitung ^{15}N dan biaya material berlabel ^{15}N (sekitar 10 US \$ g^{-1} untuk $^{15}\text{N}\text{-NO}_3$ diperkaya 10%) terdapat pembatas lain yang harus dipertimbangkan ketika melakukan penelitian ^{15}N :

- (i) Adalah penting bahwa penambahan material berlabel ^{15}N tidak mempengaruhi fiksasi N_2 . Pengaruh N mineral pada fiksasi N_2 adalah dengan baik establis, oleh karena itu penggunaan yang rendah pada aplikasi N (misalnya kurang dari 5 kg N ha^{-1}) lebih disukai. Jika sumber karbon akan digunakan untuk immobilisasi penambahan ^{15}N atau jika bahan organik berlabel ^{15}N ditambahkan, juga penting bahwa tidak terdapat stimulasi fiksasi N_2 karena pengaruh perlakuan pelabelan terhadap ketersediaan N tanah.
- (ii) Pemilihan tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 yang sesuai adalah faktor yang sangat penting mempengaruhi estimasi P. Kesalahan-kesalahan perhitungan ^{15}N yang diperoleh dari fiksasi N_2 sangat sering terjadi karena tanaman leguminosa dan referensi berbeda pada rasio N yang diasimilasi dari penambahan ^{15}N ke N yang diserap dari N tanah asli. Ini dapat dikarenakan : (1) perbedaan leguminosa dan tanaman referensi pada penyerapan N dari kedalaman tanah yang berbeda dimana terdapat perbedaan komposisi isotop N tanah tersedia bagi tanaman atau (2) perbedaan tanaman dalam pola mereka dari asimilasi N dengan waktu yang berhubungan dengan perubahan-perubahan yang berhubungan dengan waktu pada komposisi isotopik dari N tanah.



Gambar 6.1. Gambaran skematik dari prinsip yang kompleks pada teknik pelarutan ^{15}N . Pelarutan N tanah oleh N_2 atmosfer menyimpulkan komposisi ^{15}N yang rendah pada hasil leguminosa dari pertumbuhan daripada yang dihitung pada tanaman referensi dan digambarkan sebagai daerah yang dikurangi dari sektor ^{15}N dari tanaman leguminosa. Setelah Peoples *dkk.* (1988b).



Gambar 6.2. Gambaran skematik dari 4 situasi yang mungkin meningkat selama penelitian pelarutan ^{15}N isotop di lapangan. Gambar (a) sampai (c) menggambarkan perbedaan pertumbuhan komparatif akar dari leguminosa berbintil akar dan tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 dalam hipotesis studi kekayaan ^{15}N . Aplikasi material yang diperkaya dengan ^{15}N pada permukaan tanah membuat daerah dimana nitrogen tanah tersedia bagi tanaman yang diperkaya dengan ^{15}N . Kekayaan ^{15}N pada daerah ini bagaimanapun menurunkan profil tanah hingga derajat kelimpahan alami ^{15}N dicapai pada kedalaman yang dalam. Studi kasus ke-4 (d) menggambarkan leguminosa berbintil akar dan tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 pada studi kelimpahan ^{15}N alami dimana kelimpahan ^{15}N dari N tanah tersedia bagi tanaman turun secara seragam pada profil tanah.

Gambar 6.2. a-c. Menggambarkan tiga kemungkinan hubungan leguminosa dengan tanaman referensi yang dapat terjadi pada penelitian lapangan yang menggunakan perkayaan ^{15}N . Saat material yang dilabel dengan ^{15}N telah diaplikasikan tanah yang diperkaya ^{15}N tinggi lapisan dibentuk pada permukaan; namun demikian, perkayaan ^{15}N dari N tanah yang tersedia bagi tanaman menurun secara cepat dengan kedalaman. Pada Gambar 6.2a. akar leguminosa menjelajah dalam kedalaman daerah yang tidak diperkaya dengan ^{15}N buatan, sedangkan akar referensi bukan penfiksasi N_2 dibatasi terhadap daerah diperkaya paling atas.

Penyerapan N oleh leguminosa dari tanah yang tidak diperkaya akan menimbulkan estimasi fiksasi N_2 yang berlebihan, saat komposisi $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dari leguminosa dan tanaman referensi dibandingkan. Situasi kebalikannya (Gambar 6.2b.), dimana akar tanaman referensi telah tumbuh secara luas di bawah daerah yang diperkaya ^{15}N , pelarutan kandungan isotopik ^{15}N dari tanaman referensi dengan penyerapan N dari tanah yang tidak diperkaya akan menyimpulkan estimasi fiksasi N_2 oleh leguminosa yang lebih rendah. Hanya pada kondisi yang *ideal*, dimana akar dari leguminosa dan tanaman referensi menjelajah volume tanah yang sama dan menggunakan N mineral tanah diperkaya ^{15}N yang sama (Gambar 6.2c.), penentuan fiksasi N_2 yang akurat dapat diharapkan (lihat bagian 6.3.2.). Kesamaan dimana terdapat perubahan komposisi isotop didalam tanah, pool N, perhitungan fiksasi yang tepat hanya dapat diperoleh jika leguminosa dan tanaman referensi mempunyai pola penyerapan N musiman yang sama. Penurunan rasio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dalam tanah terhadap waktu barangkali menyimpulkan dari kehilangan ^{15}N tanah tersedia bagi tanaman dikarenakan penyerapan, pencucian unsur hara atau immobilisasi, dan oleh pelepasan senyawa-senyawa ^{14}N terlarut yang terus menerus melalui mineralisasi bahan organik tanah. Witty (1983) menyimpulkan bahwa penurunan ini pada tanah yang diperkaya ^{15}N berhubungan dengan perbedaan pada laju pertumbuhan dan pola akumulasi N antara leguminosa dan tanaman referensi dimana faktor-faktor utama menyebabkan estimasi fiksasi di lapangan sangat bervariasi dengan pemilihan dari tanaman-tanaman referensi yang berbeda.

Perluasan kesalahan estimasi P dimana tanaman tidak sesuai secara sempurna akan tergantung pada kesamaan dari aplikasi ^{15}N , laju perubahan konsentrasi ^{15}N dari N tanah tersedia bagi tanaman dengan waktu, dan perbedaan perkayaan ^{15}N dengan kedalaman. Ini sangat dipengaruhi oleh bentuk material ^{15}N yang digunakan dan aplikasi metoda (didiskusikan pada bagian 6.3.1.).

6.2.2. Kelimpahan ^{15}N alam

Hampir semua transformasi N dalam tanah menyimpulkan penggabungan fraksi isotopik. Pengaruh bersih adalah sebuah peningkatan kelimpahan ^{15}N dari N mineral tanah yang kecil (misalnya antara 0,368 dan 0,373 atom% ^{15}N) dibandingkan dengan N_2 atmosfer (0,3662 atom% ^{15}N). Dengan melihat perbedaan konsentrasi ^{15}N yang kecil, data biasanya dilukiskan dalam term bagian per seribu ($\delta^{15}\text{N}$ atau ‰; lihat bagian 6.3.6.). Metoda memberikan sebuah estimasi terhadap waktu yang lengkap pada penelitian yang diperkaya ^{15}N , tetapi metoda dapat diaplikasikan untuk mengestablisikan penelitian-penelitian karena perlakuan pendahuluan (yaitu aplikasi ^{15}N) tidak diperlukan meskipun prinsip dari teknik adalah sama terhadap prinsip-prinsip dari studi perkayaan ^{15}N , pembatas utama adalah sangat berbeda (dibahas oleh Bergersen 1988; Ledgard dan Peoples 1988; Mariotti *dkk.* 1983; Shearer dan Kohl 1986). Sebuah mass spektrometer rasio isotopik mampu menghitung secara tepat dengan perbedaan 0,1‰ (sekitar 0,00004 atom% ^{15}N) diperlukan dan persiapan sampel memerlukan kepedulian yang besar untuk menghindari (a) kehilangan N yang merubah kelimpahan ^{15}N dan (b) kontaminasi material yang diperkaya ^{15}N (lihat Tabel 6.1.). Juga lebih disukai untuk mempunyai $\delta^{15}\text{N}$ dari N tanah tersedia bagi tanaman yang lebih tinggi sekitar 6‰ karena ketepatan estimasi P menurun secara nyata pada nilai di bawah ini.

Penggunaan metoda kelimpahan ^{15}N alam mengasumsikan bahwa penggabungan fraksi isotopik selama fiksasi N_2 adalah nol atau dikenal nilai konstant. $\delta^{15}\text{N}$ dari N total tanaman secara penuh tergantung pada fiksasi N_2 untuk pertumbuhan (Tabel 6.4.) mungkin berbeda dari N_2 atmosfer (yang didefinisikan sebagai nol). Pada *Lupinus spp.*, perkayaan dan penekanan ^{15}N pada bagian-bagian tanaman dapat dipengaruhi oleh strain rhizobium. Beberapa strain rhizobia memproduksi bintil akar dengan $\delta^{15}\text{N}$ yang meningkat saat ditumbuhkan dengan N_2 atmosfer sebagai satu-satunya sumber N baginya; namun demikian, tajuk dari tanaman-tanaman ini mempunyai $\delta^{15}\text{N}$ yang menurun. Bagaimanapun, kesimpulan bersih berpengaruh kecil terhadap nilai dari keseluruhan tanaman *Lupin* dari asosiasi simbiotik (Bergersen *dkk.* 1986). Strain-strain rhizobia yang sama menyebabkan perubahan pada penambahan atau penipisan ^{15}N dari bagian-bagian tanaman simbiosis penuh yang berbeda belum diobservasi pada species lain (seperti kedelai, gude, atau kacang; M.B. Peoples dan D.M. Hebb, data tidak dipublikasikan). Namun, mungkin terdapat perubahan-perubahan dinamik pada $\delta^{15}\text{N}$ dari bagian tanaman secara individu selama perkembangan organ sehingga estimasi P seharusnya didasarkan pada $\delta^{15}\text{N}$ dan keseluruhan tanaman atau N total tajuk, dan tidak pada $\delta^{15}\text{N}$ dari daun

tunggal atau bagian-bagian tanaman lain (Bergersen, *dkk.*, 1988). Penggabungan fraksi-fraksi isotopik selama penyerapan N tanah telah diuji untuk jumlah yang banyak dari leguminosa dan non-leguminosa dan ditemukan tidak berarti. Jadi muncul sesuatu yang tidak diperlukan untuk membiarkan ini pada estimasi P dengan menggunakan kelimpahan ^{15}N (Shearer dan Kohl 1986).

Nilai $\delta^{15}\text{N}$ tanah rendah dan atau bervariasi telah dideteksi pada beberapa padang rumput yang digembalai secara intensif (Steele 1983) dan pada ekosistem hutan alam (Hansen dan Pate 1987). Metodologi kelimpahan ^{15}N alam oleh karena itu mungkin tidak sesuai untuk mengukur fiksasi N pada tempat khusus ini. Namun demikian, $\delta^{15}\text{N}$ telah ditemukan tinggi dan relatif seragam pada sejumlah tanah-tanah pertanaman yang memungkinkan estimasi fiksasi N_2 simbiotik akurat (misalnya, Bergersen *dkk.* 1989; Ledgard dan Peoples 1988; Rerkasem *dkk.* 1988) karena kelimpahan ^{15}N alam pada N tanah tersedia bagi tanaman mungkin juga sama dengan kedalaman tanah dan tidak muncul perubahan yang cepat dengan waktu (seperti digambarkan pada Gambar 6.2d.; lihat juga Bergersen 1988; Bergersen *dkk.* 1989; Ledgard *dkk.* 1984), pembatas utama dari teknik penambahan ^{15}N (yaitu, pemilihan tanaman referensi) mungkin relatif tidak lebih penting dengan metoda kelimpahan ^{15}N alam. Beberapa studi telah menemukan bahwa kalkulasi P tidak dipengaruhi oleh penggunaan tanaman referensi yang berbeda (Ledgard dan Peoples 1988). Dimana metoda kelimpahan alam dan penambahan ^{15}N dibandingkan, estimasi fiksasi N_2 lapangan adalah sama dengan ketelitian yang sama, bagaimanapun teknik digunakan (misalnya Tabel 6.b.; Bergersen dan Turner 1983; Ledgard dan Peoples 1988).

Tabel 6.1. Pencegahan yang diperlukan untuk perhitungan yang akurat dari kelimpahan derajat ^{15}N alam^a.

1. *Sampel-sampel yang sama* --- Untuk menghindari variasi dikarenakan tidak samanya kelimpahan ^{15}N pada jaringan tanaman yang berbeda
2. *Reagen* --- Melindungi kontamasi NH_3 dari udara di laboratorium
3. *Suhu digesti* --- Untuk meminimalkan kemungkinan kehilangan N yang terkikis ^{15}N menyimpulkan dekomposisi panas dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ selama digesti
 - Menggunakan tabung-tabung gelas tinggi dalam blok pemanas elektrik, tidak tak terkendalikan dengan labu *Kjeldahl* biasa
 - Suhu dikontrol pada suhu maksimum 310-315°C. Suhu udara yang lebih tinggi menyebabkan ulangan ^{15}N yang diperkaya tidak sama
4. *Destilasi* --- Koleksi standar dari hanya 30 mL destilat mungkin bebas setelah bekas dari ammonia yang diperkaya ^{15}N . Koleksi 80 mL destilat secara rutin untuk menjamin pencernaan kembali N secara tuntas
5. *Konsentrasi destilat* --- Menghindari evaporasi singkatnya pada kristalisasi yang terjadi pada asam borik, atau destilat menjadi kering. Pengeringan sampel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada asam borik, meskipun hanya pada 55°C, menyimpulkan pada beberapa dekomposisi panas dan kehilangan NH_3 yang terkikis ^{15}N
6. *Menghindari kontaminasi dengan material yang diperkaya ^{15}N* --- Kebersihan, pemisahan dalam waktu dan ruang antara kelimpahan alam dan material yang diperkaya dengan ^{15}N

^a Jika pencegahan jelas diteliti, pencegahan seharusnya mungkin untuk mencocokkan dalam 0,1 – 0,3 ‰, nilai ^{15}N untuk sampel larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang sama telah dianalisis secara langsung pada sebuah *mass spektrometer*, atau dianalisis setiap dan semua dari fase meliputi persiapan sampel. Informasi yang dipresentasikan disini mewakili ringkasan dari diskusi pada bagian 3 dan Bergersen (1988).

6.3. Metodologi

6.3.1. Teknik pelabelan

Tidak ada pendekatan standar yang telah dipakai untuk aplikasi material yang dilabel ^{15}N . Metoda meliputi penaburan, pembalutan, dan pencampuran secara fisik dengan tanah dan aplikasi larutan dengan penyemprotan atau penyuntikan ke dalam tanah (dibahas oleh Chalk 1985; Danso 1988; Witty *dkk.* 1988). Tipe-tipe senyawa diperkaya ^{15}N yang digunakan dapat diklasifikasikan secara luas sebagai sumber-sumber N anorganik dan immobilisasi ^{15}N .

Bentuk-bentuk immobilisasi ^{15}N digunakan untuk mencoba menjamin pelepasan N label secara sedikit demi sedikit dan menyediakan N tanah tersedia bagi tanaman yang diperkaya lebih stabil. Satu bentuk pelepasan secara perlahan telah digunakan adalah material tanaman yang dilabel ^{15}N (misalnya Boddey *dkk.* 1984). Ini mungkin sesuai dimana residu tanaman dikembalikan ke dalam tanah sebagai suatu praktek pengelolaan normal tetapi sekiranya paling sedikit berguna dimana tanaman siap untuk diestabilkan (misalnya pada rumput tahunan) dan jika gangguan tanah seharusnya dihindarkan satu lagi ketidakuntungan adalah penggunaan bahan organik yang dilabel adalah bahwa, secara ideal, tempat seharusnya ditinggalkan selama beberapa bulan untuk menstabilkan setelah penggabungan atau penambahan. Ini memerlukan penelitian dan tempat lapang direncanakan dan dialokasikan satu tahun atau lebih sebelumnya.

Pendekatan alternatif telah menggunakan formulasi pelepasan ^{15}N secara lambat (misalnya penggabungan ^{15}N ke dalam pellet/butir-butir gips), atau menambahkan ^{15}N larutan garam dengan sumber-sumber karbon yang siap tersedia (misalnya, sukrosa) sehingga ^{15}N diikat di dalam biomassa tanah (lihat Giller dan Witty 1987; Witty 1983). Sementara pada beberapa penelitian lapang telah membuktikan bahwa pupuk pellet lebih baik daripada pupuk ^{15}N terlarut, pellet sulit untuk digabungkan ke dalam tanah dan didistribusikan merata yang tidak terjadi dengan kedalaman.

Penggunaan karbon untuk mengimmobilisasi pupuk ^{15}N telah direkomendasikan oleh beberapa penulis, tetapi kepedulian harus diambil untuk menjamin bahwa penambahan sumber-sumber karbon *exogenous* juga tidak mengimmobilisasi N mineral tanah asli dan atau secara jelas merubah aktivitas mikrobia tanah.

Metoda perkayaan tanah secara buatan yang sangat umum digunakan adalah dengan penambahan pupuk ^{15}N anorganik secara langsung.

Beberapa laporan (misalnya Chalk 1985; Danso *dkk.* 1988; Rennie 1986; Witty *dkk.* 1988) telah membandingkan metoda-metoda pelabelan tanah yang memperkecil variabilitas dan perubahan-perubahan sementara pada perkayaan ^{15}N . Beberapa penelitian mendukung penambahan sejumlah kecil ^{15}N ke tanah berurutan pada jarak setelah masa pertumbuhan. Beberapa lainnya percaya bahwa setiap prosedur dapat menyimpulkan perbedaan pada perkayaan ^{15}N dari pool N tanah di bawah leguminosa dan tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 jika kedua tipe tanaman tidak mengasimilasi N mineral pada jumlah yang sama, dan mereka lebih menyukai untuk menggunakan aplikasi tunggal ^{15}N pada awal dari masa pertumbuhan.

Beberapa peneliti telah mengaplikasikan jumlah tinggi dari pupuk N (sering pada perkayaan ^{15}N yang berbeda) pada tanaman referensi daripada leguminosa. Teknik ini diperkenalkan oleh Fried dan Broeshart (1975) untuk membiarkan tanaman bukan penfiksasi tumbuh dengan laju yang sebanding terhadap leguminosa pada ketersediaan N tanah yang rendah dan sehingga memberikan referensi yang lebih sesuai.

Pendekatan ini didasarkan pada dasar pemikiran bahwa tanaman dengan lebih dari satu sumber N tersedia akan menyerap dari sumber-sumber ini pada proporsi terhadap jumlah relatif; yaitu tidak akan terdapat satu sumber N yang lebih disukai daripada yang lain. Ini disebut modifikasi *nilai A* yang secara luas telah digunakan pada beberapa studi leguminosa; namun demikian, karena teknik tergantung pada jumlah penambahan pupuk dan penemuan kembali pupuk N, kesalahan dapat diharapkan jika kehilangan pupuk N terjadi selama penelitian (Chalk 1985). Pada saat ini, keraguan-raguan yang sangat sungguh-sungguh membuat asumsi dasar melekat pada metoda ini; yaitu bahwa terdapat efisiensi penggunaan pupuk yang sama dengan referensi yang dipupuk berat dan leguminosa yang dipupuk ringan, dan bahwa *nilai A* tidak tergantung dari jumlah aplikasi N pada semua tanaman (Smith *dkk.* 1989).

Pemilihan teknik pelabelan akan mempengaruhi derajat perkayaan ^{15}N dari material dilabel yang digunakan, seperti peralatan yang digunakan pada analisis ^{15}N berikutnya (bagian 6.3.4.). Karena *emisi spektrometer* kurang akurat daripada *mass spektrometer*, derajat aplikasi perkayaan ^{15}N ke tanah ($0,15 - 0,2 \text{ g } ^{15}\text{N m}^{-2}$) perlu lebih tinggi daripada penelitian yang sama dimana *mass spektrometer* digunakan ($0,05 - 0,10 \text{ g } ^{15}\text{N m}^{-2}$).

6.3.2. Seleksi tanaman referensi yang sesuai

Hanya satu jalan pasti untuk memeriksa apakah genotipe bukan leguminosa, leguminosa tidak diinokulasi (memerlukan tanah tanpa rhizobium efektif), atau leguminosa tidak berbintil akar mewakili tanaman referensi yang cocok untuk penelitian-penelitian larutan isotop adalah dengan mengestimasi apakah leguminosa dan referensi mengasimilasi penambahan ^{15}N dan N tanah asli pada rasio yang sama. Wagner dan Zapata (1982) mengestimasi rasio ini secara tidak langsung dengan menghitung penyerapan relatif dari sulfur dilabel dan sulfur tanah asli (mengasumsikan kemasaman asimilasi N dan S dari tanah). Ledgard *dkk.* (1985) dengan metoda regresi menghitung penyerapan relatif dari ^{15}N dan N tanah. Ini meliputi dua atau lebih perlakuan dengan jumlah penambahan N yang sama tetapi beda pada konsentrasi ^{15}N , dan perlakuan kelimpahan ^{15}N alam. Jika setiap prosedur pemeriksaan tidak mungkin, kriteria berikut perlu dipertimbangkan dalam menseleksi tanaman-tanaman referensi (setelah Chalk 1985; Danso 1988; Witty 1988) :

- (i) ketidakterdapatnya kemampuan fiksasi N_2 . Pada daerah beriklim subtropik, fiksasi N_2 dihubungkan dengan kemunculan non-leguminosa yang tidak penting, tetapi pada lingkungan tropika, fiksasi N_2 dihubungkan dengan beberapa non-leguminosa yang dapat mensuplai sampai 40% dari N tanaman (Boddey 1987). Hal ini penting untuk memeriksa setiap aktivitas tanaman-tanaman referensi non-leguminosa (misalnya, menggunakan reduksi acetylen) atau membandingkan beberapa tanaman referensi yang berbeda. Meskipun genotipe leguminosa tidak berbintil akar tidak seharusnya secara penuh tergantung. Sering sifat tidak berbintil akar adalah spesifik terhadap strain rhizobium, dan pengembalian kembali genotipe ke tipe berbintil akar adalah tidak luar biasa. Penggalan sistem perakaran dari jalur leguminosa dan pengujian bintil akar harus rutin saat pemanenan referensi ^{15}N .
- (ii) Kesamaan pada daerah perakaran dari referensi dan leguminosa. Ini dapat diuji dengan menghitung panjang dan keadaan akar, atau secara tidak langsung melalui perbandingan dari kekayaan ^{15}N pada perbedaan potensi tanaman referensi; terutama jika jalur bukan berbintil akar dari leguminosa test disertakan. Perbedaan pola perakaran sering diindikasikan dengan penemuan kembali ^{15}N yang berbeda.

- (iii) Pada penyerapan N relatif dari leguminosa dan referensi harus sama. Witty (1983) menjelaskan bagaimana untuk menguji ini, dan kondisi yang mana setiap kesalahan dapat dikurangi. Jika penyerapan N tetap untuk tanaman yang akan diuji tidak dapat ditentukan, leguminosa dan referensi paling tidak diawali untuk mengakumulasi N dan mencapai kandungan N maksimumnya pada waktu yang sam
- (i) Durasi waktu pertumbuhan. Karena pengkayaan ^{15}N pada pool N tanah tersedia bagi tanaman dapat berubah terhadap waktu (khususnya segera setelah aplikasi ^{15}N), adalah penting bahwa kedua tanaman menyerap rasio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ yang sama dari tanah selama keseluruhan masa pertumbuhan.
- (ii) Sistem perakaran yang digunakan. Pemilihan tanaman referensi dibatasi pada studi padang rumput-leguminosa atau tanaman campuran. Pada setiap campuran yang intim dari species penfiksasi N_2 dan bukan penfiksasi N_2 , adalah penting bahwa transfer N antar tipe-tipe tanaman tidak harus terjadi, sebab ini akan menimbulkan estimasi fiksasi N_2 oleh leguminosa lebih rendah. Pada prakteknya, transfer N muncul sebagai proses yang relatif lambat dan pengaruhnya terhadap estimasi P dapat dibatasi dengan pembatasan periode perhitungan.

Sebaiknya dicatat bahwa kesalahan-kesalahan yang berhubungan dengan ketidakcocokan tanaman penfiksasi N_2 dan referensi menjadi sangat penting saat hanya proporsi kecil dari N leguminosa diperoleh dari atmosfer. Pada kondisi ini, variasi-variasi minor pada perkayaan ^{15}N sangat dapat diperbesar saat kalkulasi fiksasi N_2 . Namun demikian, kesalahan-kesalahan menjadi lebih kecil dan ketidakcocokan kurang penting jika jumlah fiksasi N_2 leguminosa meningkat.

6.3.3. Model plot dan prosedur pengambilan sampel

Adalah tidak mungkin untuk mendefinisikan penelitian protokol tunggal yang memberikan estimasi fiksasi N_2 yang akurat dengan ^{15}N pada keadaan tersebut. Apa yang cocok untuk satu tanaman, atau lingkungan mungkin tidak cocok di tempat lain.

Mungkin faktor yang sangat penting mempengaruhi model dari percobaan lapangan mungkin tujuan dari penelitian. Alasan yang jelas dan singkat untuk melaksanakan penelitian adalah perlu sekali untuk kesuksesan perencanaan. Tujuan penelitian akan mempengaruhi seleksi dari tempat penelitian, perlakuan yang digunakan, dan interpretasi data. Tempat

penelitian seharusnya mendekati derajat tipe tanah yang homogen dengan kesuburan dan keberadaan N yang sama (Reichardt *dkk.* 1987). Areal harus cukup untuk menyediakan daerah penyangga antar *plot* yang cukup drainase parit untuk mencegah kontaminasi silang oleh pergerakan air permukaan pada inokulasi rhizobium atau percobaan-percobaan strain, melindungi melawan ternak, dan pada penelitian yang besar desakan pergerakan peralatan mesin. Pedoman lebih jauh untuk perencanaan dan melaksanakan penelitian-penelitian lapangan diberikan oleh Brockwell (1980) dan Wayne *dkk.* (1987).

Kesalahan dalam perhitungan fiksasi N_2 simbiosis meningkat karena metoda larutan isotop memerlukan pengetahuan dasar yang belum dipenuhi. Persyaratan-persyaratan ini (Tabel 6.2.) seharusnya dipertimbangkan dengan hati-hati sebelum penelitian dilakukan. Yang lebih mendekati dan lebih akurat yang dapat ditemukan, akan menjadi hasil dari estimasi fiksasi N_2 .

Model penelitian untuk menghitung fiksasi N_2 dari kelimpahan ^{15}N alam, pada dasarnya sama dengan studiperkayaan ^{15}N , yaitu perlu untuk memiliki tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 yang ditumbuhkan berdekatan terhadap tanaman penfiksasi N_2 untuk mengurangi pengaruh dari setiap variabilitas lokasi terhadap perhitungan (Bergersen 1988; Reichardt *dkk.* 1987). Idealnya, tanaman segera ditanam berdekatan pada tanah yang sama dimana tanaman uji leguminosa penfiksasi N_2 tumbuh dan harus dipanen. Ini dapat dicapai oleh penggunaan jalur bukan berbintil akar atau leguminosa tidak diinokulasi pada perlakuan perlindungan baris pada penelitian pertanaman, atau menggunakan bukan leguminosa pada tanaman campuran atau studi-studi padang rumput campuran sebagai referensi (misalnya Bergersen dan Turner 1983; Bergersen *dkk.* 1989; Rerkasem *dkk.* 1988). Dimana tanaman-tanaman referensi tidak dapat secara baik dimasukkan ke dalam *plot* uji leguminosa, pisahkan *plot* tempat referensi yang secara praktis berdekatan terhadap *plot* uji yang akan diperlukan pada model penelitian (misalnya Evan *dkk.* 1987; Reichardt *dkk.* 1987).

Karena proporsi fiksasi N_2 dapat dihitung tanpa menghitung hasil tanaman, estimasi ^{15}N yang diperoleh dari fiksasi N_2 biasanya memiliki koefisien variasi yang lebih kecil dari fiksasi N_2 yang diperoleh dengan metoda perbedaan-N. Dikarenakan hal ini maka pada penelitian pengkayaan ^{15}N tidak perlu melabel areal yang luas dari lapang dengan isotop. Namun demikian, subplot dan areal panen harus cukup untuk menghindari pengaruh tepi/pinggiran dikarenakan pergerakan ^{14}N dan ^{15}N dalam tanah (untuk diskusi kesalahan-kesalahan yang berhubungan dengan ukuran *plot*

dan pergerakan ^{15}N dari *plot* yang tidak dibatasi lihat San Chez *dkk.* 1987). Pengaruh-pengaruh tepi/pinggiran dapat dikurangi dengan menutup subplot ^{15}N dengan lempengan metal yang dimasukkan ke dalam tanah (misalnya Bergersen dan Turner 1983; Evan *dkk.* 1987). Terlepas dari biaya isotop, pemilihan areal aplikasi ^{15}N ditentukan oleh jarak baris, dan kepadatan tanaman yang menurut gilirannya akan ditentukan oleh kebiasaan pertumbuhan leguminosa khusus dalam pengujian (Brockwell 1980). Adalah cocok untuk membuang satu atau dua baris luar dari subplot dan untuk memanen hanya baris-baris yang di tengah. Dengan beberapa leguminosa pangan, contohnya areal yang sesuai untuk penambahan ^{15}N mungkin 1,5 sampai 2 m², dengan areal (meliputi tiga atau empat baris tanaman) dari 0,6 sampai 1 m² akan diambil (sama dengan 15 sampai 30 tanaman pada kebanyakan tanaman) untuk menghitung kekayaan ^{15}N (Witty *dkk.* 1988). Penggunaan subplot seperti itu menghemat areal dan sehingga mendorong pengulangan. Estimasi hasil N total tanaman dari jumlah fiksasi N₂ yang dikalkulasi, seharusnya diambil dari yang lebih luas dari yang mengelilingi *plot* (bagian 3.1.1.).

Seandainya hanya satu panen yang akan diambil untuk memberikan estimasi fiksasi N₂ musiman adalah diperlukan sekali bahwa tanaman dipanen pada kedewasaan fisiologis daripada kedewasaan penuh setelah selesai perontokan. Ketidakeragaman distribusi ^{15}N pada organ tanaman telah dicatat baik pada penelitian-penelitian pengkayaan ^{15}N atau kelimpahan ^{15}N alam dikarenakan : (a) Perubahan pengkayaan ^{15}N tanah atau kontribusi relatif penyerapan N tanah dan fiksasi N₂ selama periode pertumbuhan saat berbagai jaringan tanaman ditentukan, atau (b) diskriminasi isotop antar proses-proses metabolik tanaman (Bergersen *dkk.* 1988, 1989; Chalk 1985). Oleh karena itu adalah penting untuk memanen keseluruhan tanaman sebelum daun-daun jatuh atau jaringan hilang untuk estimasi akurat dari fiksasi N₂. Untuk alasan yang sama ini, bagian-bagian tanaman tidak seharusnya dipisahkan dan setiap pengambilan sub-sampel seharusnya dilaksanakan berdasarkan keseluruhan tanaman. Namun demikian hal ini tidak praktis pada penelitian leguminosa berkayu tahunan. Sebagai contoh pengambilan sub-sampel dari pohon dewasa jaringan mungkin dibatasi untuk pertumbuhan kembali jika mereka dipangkas pada interval yang tetap untuk makanan ternak atau sebagai mulsa pupuk hijau (Nair 1988). Sementara beberapa studi pohon leguminosa telah menggunakan ^{15}N (misalnya Cornet *dkk.* 1985), masalah-masalah spesifik dari pengambilan sampel dan pemilihan tanaman referensi telah menjadi perhatian penuh.

Tabel 6.2. Persyaratan teknik larutan ^{15}N untuk menghitung fiksasi N_2 ^a

1. Tanaman referensi yang diperkaya dengan $^{15}\text{N} = \text{N}$ mineral tanah yang diperkaya ^{15}N benar jika
 - Tidak ada diskriminasi antara ^{15}N dan ^{14}N dalam tanah
 - Kontrol tidak menfiksasi N_2
 - Tidak ada diskriminasi isotop pada N asimilasi dan metabolisme
 - Sampel bagian-bagian tanaman mewakili keseluruhan tanaman
 - Pada benih tanaman kecil N tidak memiliki pengaruh, atau tidak diperhitungkan
2. Pool N tanah referensi = N pool tanah leguminosa, benar jika leguminosa dan referensi
 - Ditanam untuk rentangan waktu yang sama
 - Ditanam pada tanah yang sama
 - Mendapat N dari pool N tanah yang sama
 - (a) memiliki pola penyerapan yang sama
 - (b) distribusi ^{15}N dalam tanah seragam
 - (c) tanah yang diperkaya stabil dengan waktu
3. Leguminosa mengambil N tanah dan N pupuk pada proporsi yang mewakili di dalam tanah, benar jika
 - Tidak ada diskriminasi antara ^{15}N dan ^{14}N
 - Tidak ada diskriminasi antara bentuk N yang berbeda
4. Bahwa proses penghitungan tidak mempengaruhi fiksasi N_2 , benar jika
 - Penambahan pupuk tidak mempunyai pengaruh
 - N mineral tanah tersedia dipengaruhi jika sumber karbon digunakan untuk memobilisasi ^{15}N , atau jika bahan organik dilabel ^{15}N dicampurkan
5. Bahwa metoda menghitung jumlah fiksasi N_2 , benar jika
 - Semua fiksasi N ditemukan kembali dalam tanaman

Diadaptasi dari Witty *dkk.* (1988)

Jika penelitian-penelitian kelimpahan ^{15}N alam dan pengkayaan ^{15}N akan dilakukan pada tempat penelitian yang sama, adalah penting bahwa plot kelimpahan alam selalu diambil sampelnya dan diurus sebelum diteruskan ke plot yang diperkaya ^{15}N . Guna menjamin tidak terdapat pemindahan sedikit dari material yang diperkaya ^{15}N ke sampel-sampel kelimpahan alam. Pisahkan peralatan (misalnya *secateurs*) harus digunakan untuk memanen dan mengoleksi jaringan tanaman atau tanah dari setiap plot dimana mungkin sebagai alternatif semua barang-barang yang digunakan untuk panen harus dicuci dan disikat sebelum dipakai kembali (lihat Bergersen 1988).

6.3.4. Persiapan sampel dan analisis

Persiapan sampel untuk analisis akan tergantung pada peralatan yang digunakan untuk perhitungan ^{15}N .

Mass spektrometer memisahkan molekul-molekul N_2 dengan ionisasi ke dalam bentuk mass 28 ($^{14}\text{N}_2$), 29 ($^{14}\text{N} : ^{15}\text{N}$) dan 30 ($^{15}\text{N}_2$) dan secara elektrik menghitung konsentrasi relatif dari ion-ion. Biasanya N_2 dihasilkan dari NH_4^+ (diperoleh dari digesti *Kejldahl* dan destilasi, bagian 3) oleh oksidasi dengan reagen seperti Na atau Li-hypobromit. Reaksi ini dilaksanakan pada kotak kosong dan N_2 diproduksi dimasukkan ke dalam mass spektrometer. Beberapa sistem secara langsung mengoksidasi material tanaman untuk memproduksi N_2 untuk analisis (jelasnya lihat Bergersen 1980; Fiedler 1984).

Emisi spektrometer optik menggunakan prinsip yang berbeda. Pada metoda ini, N_2 dihasilkan oleh pemanasan material tanaman giling dengan Copper oxida dalam gelas tabung gelas tersegel. Jika distimulasi oleh pelepasan elektrik melalui tabung, berbagai species N_2 memancarkan radiasi UV pada panjang gelombang yang berbeda dan intensitas relatif dari pita emisi dihitung (jelasnya lihat Bergersen 1980; Fiedler 1984). Perhitungan intensitas pita sendiri tidak selalu menghasilkan kalkulasi kelimpahan ^{15}N yang benar. Ketika perhitungan dilakukan pada *spektrometer emisi* model 1-4 atau No. 1-5 penggunaan kurva kalibrasi disiapkan dari sekumpulan tabung-tabung kalibrasi adalah penting untuk menentukan intensitas pita yang benar (Fiedler 1984). Spektrometer emisi lebih murah daripada *mass spektrometer* dan dapat menggunakan sedikit sampel N (<10 μg tetapi kurang sensitif dan tepat dalam penghitungan kandungan ^{15}N sampel.

Peralatan adalah sangat sesuai hanya dimana standar deviasi dari ulangan sampel 3% dapat diterima dan dimana nilai ^{15}N sampel lebih dari 0,05 - 0,10 kelebihan atom% (Bergersen 1980). Kepedulian yang besar juga diperlukan dengan persiapan sampel saat analisis jumlah N yang kecil karena

kontaminasi kemungkinan besar menjadi sangat penting. Sementara mass spektrometer adalah metoda penentuan ^{15}N tertua, sangat akurat dan digunakan secara luas, sebagian besar peralatan memerlukan ukuran sampel 0,5 - 1 mg N. Namun demikian, beberapa mass spektrometer terbaru dapat menganalisis sampel < 100 μg N.

6.3.5. Hubungan antara rasio isotop, atom% ^{15}N dan $\delta^{15}\text{N}$

Mass spektrometer menghitung rasio isotop R, pada sampel N_2

$$R = \frac{\text{massa 29}}{\text{massa 28}} = \frac{b}{a} \quad (1)$$

Dimana a adalah signal yang dihasilkan oleh ion massa 28 ($^{14}\text{N}_2$) dan b diproduksi oleh ion massa 29 ($^{14}\text{N} : ^{15}\text{N}$). Signal-signal ini sebanding terhadap konsentrasi relatif molekul dari massa 28 dan 29 pada sampel N_2 . Rasio $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ kadang-kadang digunakan untuk mengkalkulasi δ .

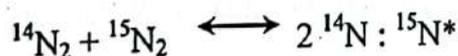
$$\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} = \frac{b \cdot 2^{-1}}{a + b \cdot 2^{-1}} = \frac{b}{2a + b} = \frac{R}{2 + R} \quad (2)$$

Tetapi ini mengabaikan keberadaan dari jumlah $^{15}\text{N}_2$ (massa 30) yang tidak dideteksi pada sampel N_2 massa yang diseimbangkan. Istilah atom% ^{15}N (% atom N yaitu ^{15}N) biasanya digunakan untuk menjelaskan kelimpahan ^{15}N dalam sampel N_2 yang dihasilkan dari senyawa-senyawa yang mengandung N.

$$\text{Atom \% } ^{15}\text{N} = \frac{100 (b \cdot 2^{-1} + c)}{a + b + c} \quad (3)$$

dimana c adalah signal yang diproduksi oleh ion massa 30 ($^{15}\text{N}_2$).

Keseimbangan pada suhu kamar, dalam reaksi :



$$k = b^2 a c^{-1} = 4, \text{ yaitu } c = b^2 4a^{-1}$$

Penggantian pada (3).

- Keseimbangan ini tidak dicapai pada suhu kamar kecuali N_2 dihasilkan dari sumber monatomik seperti NH_4^+ , karena molekul N_2 sangat tidak reaktif. Sebagai akibatnya, proporsi tidak seimbang ada, saat sampel N_2 dihasilkan dari sumber yang diperkaya ^{15}N tinggi dicampur dengan N_2 udara.

$$\begin{aligned} \text{Atom \% } ^{15}\text{N} &= \frac{100 (b \cdot 2 + b^2 \cdot 4a)}{(a + b + b^2 \cdot 4a^{-1})} \\ &= \frac{100 (2ab + b^2)}{(4a^2 + 4ab + b^2)} \\ &= \frac{100 (b \cdot a^{-1})}{(2 + b \cdot a^{-1})} \quad \text{dari (1)} \\ &= \frac{100 R}{2 + R} \quad (4) \end{aligned}$$

Namun demikian pada nilai atom% yang tinggi, kalkulasi di atas menjadi tidak akurat karena k tidak sama tepatnya dengan 4. Oleh karena itu kasus ini, semua puncak pada massa 28, 29, dan 30 harus dihitung dan atom% dikalkulasi seperti pada (3). Ini juga harus dilakukan untuk sampel N_2 dimana molekul massa 28, 29 dan 30 tidak dalam keseimbangan. Istilah $\delta^{15}\text{N}$ (‰) dapat dikalkulasi pada 3 jalan untuk memberikan nilai yang mirip tetapi tidak sama.

$$(i) \delta = \frac{1000 (R \text{ sampel} - R \text{ standar})}{R \text{ standar}} \quad (5)$$

Dimana standar biasanya N_2 atmosfer (0,3663 atom%) atau standar lain yang diketahui berhubungan dengan N_2 atmosfer. Dengan definisi $\delta^{15}\text{N}$ dari N_2 udara oleh karena itu adalah 0 (nol).

$$(ii) \delta = \frac{1000 ({}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ sampel} - {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ standar})}{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ standar}} \quad (6)$$

atau

$$(iii) \delta = \frac{1000 [(\text{atom \%N}) \text{ sampel} - (\text{atom \%N}) \text{ standar}]}{(\text{atom \%N}) \text{ standar}} \quad (7)$$

Berdasarkan pada pernyataan yang digunakan dan sampel yang diperkaya dari (1) sampai (4) di atas adalah jelas bahwa ada sedikit perbedaan nilai δ akan dikalkulasi. Pengaruh-pengaruh ini ditunjukkan pada contoh-contoh berikut pada 4 derajat pengkayaan :

R	0,00735293*	0,00736764	0,007499999	0,00882352	0,0220588
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	0,003663*	0,003670	0,003736	0,004392	0,0100909
Atom% N	0,3663*	0,3670	0,3736	0,4392	1,0909
$\delta \text{ } ^{15}\text{N}$ (i)	0°	2,00	20,0	200	2000
$\delta \text{ } ^{15}\text{N}$ (ii)	0°	1,91	19,9	199	1978

- nilai untuk N udara sebagai standar.

Untuk mengubah nilai δ menjadi atom% ^{15}N

(a) dimana δ dikalkulasi seperti pada (5) di atas :

R sampel = R standar $(1 + \delta 1000^{-1})$ dan

$$\text{atom\% } ^{15}\text{N} \text{ sampel} = \frac{100 \text{ R sampel}}{(2 + \text{R sampel})}$$

(b) dimana δ dikalkulasi seperti pada (6) di atas :

$$\text{atom\% } ^{15}\text{N} \text{ sampel} = (\text{atom\% } ^{15}\text{N} \text{ standar}) (1 + \delta 1000^{-1})$$

6.3.6. Evaluasi data analisis dan estimasi fiksasi N_2

6.3.6.1. Pengkayaan ^{15}N

Prosentase fiksasi N_2 oleh leguminosa dari N_2 atmosfer (P) diestimasi dari rumus sebagai berikut :

$$P = 100 \times \left[1 - \frac{(\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ berlebih pada N leguminosa})}{(\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ berlebih pada N yang diperoleh dari tanah})} \right] \quad (8)$$

Dimana atom % ^{15}N berlebih = (atom % ^{15}N sampel - atom % ^{15}N N_2 udara) dimana atom % ^{15}N N_2 udara adalah 0,3663. Atom % ^{15}N N_2 yang diperoleh dari tanah umumnya diestimasi dari atom % ^{15}N tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 yang ditumbuhkan pada tanah yang sama terhadap periode waktu yang sama seperti leguminosa.

Contoh kalkulasi P dan estimasi fiksasi N (kg ha^{-1}) menggunakan metoda pengkayaan ^{15}N dipresentasikan pada Tabel 6.3. dan 6.6. (lihat juga diskusi berturut-turut pada akhir bagian 6.3.6.2.). Data diambil dari penelitian lapangan pada aplikasi tunggal dari 0,4 g K^{15}NO_3 (ca. 95 atom% ^{15}N) yang dikeringkan di tanah pasir (untuk menjamin aplikasi ke tanah yang seragam) dibuat baik pada leguminosa uji (*Lupin*) dan referensi (Gandum) pada *plot* kecil 0,9 x 0,9 m (aplikasi pupuk ^{15}N = 0,7 kg N ha^{-1}) dibatasi oleh pelindung metal yang dimasukkan 0,12 m ke dalam tanah dan menjangkau 5 baris (Evan *dkk.* 1987). Enam tanaman sampel dari setiap 4 ulangan *plot* kecil 128 hari setelah penanaman, dan 0,44 m^2 dari setiap *plot* kecil di panen pada hari ke 193.

6.3.6.2. Kelimpahan ^{15}N alam

Estimasi P diperoleh dengan menggunakan rumus analogi terhadap rumus (8) berikut :

$$P = 100 \times \frac{\delta^{15}\text{N} (\text{N tanah}) - \delta^{15}\text{N} (\text{N leguminosa})}{[\delta^{15}\text{N} (\text{N tanah}) - B]} \quad (9)$$

dimana $\delta^{15}\text{N}$ (N tanah) biasanya diperoleh dari tanaman referensi yang ditumbuhkan pada tanah yang sama seperti leguminosa, dan B adalah $\delta^{15}\text{N}$ dari tanaman penfiksasi N_2 saat ditumbuhkan dengan N_2 sebagai satu-satunya sumber N. Penggabungan fraksi isotopik selama fiksasi N_2 adalah kecil sekali tetapi bukan nol dan harus dimasukkan dalam perhitungan. Nilai B ditentukan dengan analisis $\delta^{15}\text{N}$ dari N total yang diakumulasi oleh leguminosa berbintil akar yang ditumbuhkan pada media bebas-N. Idealnya nilai B harus disiapkan untuk setiap studi species leguminosa baru. Sebagai contoh, nilai B dari sejumlah leguminosa yang berbeda dipresentasikan pada Tabel 6.4. Nilai yang sesuai digunakan dalam rumus (9) akan tergantung dari sampel jaringan untuk analisis (misalnya hanya tajuk, atau tajuk dan akar-akar yang digali).

Tabel 6.3. Kandungan ^{15}N pada tajuk *Lupin* dan tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 (Gandum) dari plot kecil yang diperkaya ^{15}N , dan kalkulasi proporsi N tanaman yang diperoleh dari fiksasi N_2 (P)^a

Species	Hari setelah penanaman					
	128			139		
	Atom% ^{15}N	Kelebihan atom% $^{15}\text{N}^b$	p^c	Atom% ^{15}N	Kelebihan atom% $^{15}\text{N}^b$	p^c
Lupin	0,4344	0,0681	78,6	0,4112	0,0449	84,5
Gandum	0,6852	0,3189	-	0,6561	0,2898	-

^a diperoleh dari data Evan *dkk.* (1987). Rata-rata 4 ulangan.

^b kalkulasi kelebihan atom% $^{15}\text{N} = (\text{atom \% } ^{15}\text{N} \text{ sampel}) - (\text{atom \% } ^{15}\text{N} \text{ N}_2 \text{ udara})$
dimana atom % ^{15}N udara = 0,3663.

^c kalkulasi dari rumus (8)

Tabel 6.4. Contoh $\delta^{15}\text{N}$ dari N total dari leguminosa berbintil akar efektif yang ditumbuhkan pada media bebas gabungan N

Species	$\delta^{15}\text{N}$ dari bagian-bagian tanaman (‰)	
	Hanya tajuk	Keseluruhan tanaman
<i>Lupinus spp.</i>	-0,55 ^a	-0,05 ^b
<i>Vigna umbellate</i>	-0,91	-0,04 ^c
<i>Glycine max</i>	-1,30	-0,79 ^d
<i>Cajanus cajan</i>	-0,90	-0,29 ^e
<i>Arachis hypogea</i> Tipe Spanyol	0,86	
	0,65 ^f	0,70 ^e
<i>Arachis hypogea</i> Tipe Virginia	0,67 ^f	0,73 ^e
<i>Lablab purpureus</i>	-1,36	-0,14 ^e
<i>Desmodium uncinatum</i>	-0,56	0,06
<i>Centrosema spp.</i>	-1,08	0,03 ^e
<i>Stylosanthes hamata</i>	-0,26	-0,23 ^e
<i>Calopogonium spp.</i>	-0,95	0,05 ^e
<i>Pueraria spp.</i>	-1,22	0,10 ^e
<i>Medicago sativa</i>	-0,29 ^g	- ^h
<i>Trifolium pretense</i>	-0,88 ^g	- ^h
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-1,97 ^g	- ^h
<i>Vicia faba</i>	-0,63 ^g	- ^h
<i>Pisum sativum</i>	-1,00 ^g	- ^h

^a Evan dkk. (1987) dengan R. lupini strain WU425

^b Bergersen dkk. (1986) – rata-rata dari 12 starin R. lupini

^c Rerkasem dkk. (1988)

^d Bergersen dkk. (1988)

^e M.B. Peoples dan D.M. Hebb, data tidak dipublikasikan

^f Termasuk pegs dan kacang-kacangan

^g Mariotti dkk. (1983)

^h Tidak dilaporkan

Sebuah contoh penentuan P menggunakan prosedur kelimpahan ^{15}N dipresentasikan pada Tabel 6.5. tanaman *Lupin* dipanen dua kali selama musim pertumbuhan tanaman (pada 128 dan 193 hari setelah tanam) untuk N tanaman dan ^{15}N . Kelimpahan ^{15}N dari leguminosa dan tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 (Gandum) pada setiap pengambilan contoh memberikan estimasi rata-rata P untuk tanaman *Lupin* dari penanaman sampai panen. Kalkulasi, masukkan fiksasi N_2 pada Tabel 6.6. (yaitu N tanaman x P 1000^{-1})

juga dipresentasikan kembali jumlah dari fiksasi N_2 terhadap periode dari penanaman sampai waktu panen. Oleh karena itu jumlah dari fiksasi N_2 diperoleh dari perbedaan interval waktu antar panen. Prosedur untuk kalkulasi standar kesalahan dari estimasi P dan fiksasi N_2 dijelaskan pada lampiran Bergersen *dkk.* (1989).

Tabel 6.5. Kelimpahan ^{15}N alam pada tajuk Lupin dan tanaman referensi bukan penfiksasi N_2 (Gandum) dan kalkulasi proporsi dari tanaman yang diperoleh dari fiksasi N_2 (P) ^a

Species	Hari setelah penanaman					
	128			139		
	Atom% ^{15}N	$\delta^{15}\text{N}^b$	p^c	Atom% ^{15}N	$\delta^{15}\text{N}^b$	p^c
Lupin	0,36629	- 0,03	88,4	0,36642	0,33	81,3
Gandum	0,36774	3,93	-	0,36782	4,15	-

^a Dambil dari data Evan *dkk.* (1987). Rata-rata dari 6 ulangan.

^b Kalkulasi dari rumus (7) bagian 6.3.5., dimana atom% ^{15}N standar = 0,3663 atom% ^{15}N

^c Kalkulasi dari rumus (9), dimana $B = -0,55$ (Tabel 6.4.)

Tabel 6.6. Kalkulasi pola musiman dari fiksasi N_2 tanaman *Lupin* di lapangan dengan menggunakan teknik pengkayaan ^{15}N dan kelimpahan ^{15}N alam

Periode (hari)	N tanaman (kg ha^{-1}) ^a	Estimasi P (Proporsi N tanaman dari fiksasi N_2)		Estimasi fiksasi N (kg ha^{-1}) ^d	
		Perkayaan- ^{15}N ^b	Kelimpahan alam ^c	I	II
		I	II	I	II
(A) 0-128	136	78,6	88,4	106,9	120,2
(B) 0-193	306	84,5	81,3	258,6	248,8
128-193	170	89,4 ^f	75,9	151,7 ^e	128,6 ^e

^a diambil dari data Evan *dkk.* (1987).

^b dari Tabel 6.3.

^c dari Tabel 6.5.

^d kalkulasi sebagai tanaman $\text{N} \times \text{P} \ 1000^{-1}$

Estimasi fiksasi N dengan pengkayaan ^{15}N (I) atau ^{15}N kelimpahan alam (II) teknik di dalam 12% diantara keduanya

^e Peningkatan nilai pada panen antara 128 dan 193 hari setelah tanam

dikalkulasi dengan perbedaan-N, seperti (B) – (A)

^f Peningkatan estimasi fiksasi N/ perubahan peningkatan N tanaman) x 100

6.3.6.3. Pengaturan N benih

Saat tanaman kecil dipanen untuk penentuan fiksasi N_2 ulangan pelarutan isotop, N benih dapat mewakili sejumlah yang berarti dari N total leguminosa dan atau mempengaruhi pengkayaan ^{15}N dari bahan kering (terutama pada studi kelimpahan ^{15}N alam). Sampel dari persediaan benih asli ditanam pada penelitian harus selalu disimpan untuk analisis, dan kalkulasi diatur untuk menghitung kontribusi dari N benih jika perlu. Kesalahan yang mirip bisa juga dihasilkan dari N benih dari tanaman referensi mengakibatkan estimasi pengkayaan ^{15}N dari pool N tanah yang tersedia bagi tanaman lebih rendah, ini sebaliknya akan menghasilkan estimasi fiksasi N_2 lebih rendah jika rumus (8) atau (9) digunakan. Setiap kesalahan mungkin tergantung pada rasio N benih referensi : N total referensi pada panen dan dapat dikoreksi menggunakan rumus berikut :

$$\text{Pengkayaan } ^{15}\text{N} \text{ (pool N tanah)} = \frac{\text{Pengkayaan } ^{15}\text{N} \text{ (N referensi)} \times \text{N total referensi}}{(\text{N total referensi} - \text{N benih referensi})} \quad (10)$$

7

SIMPULAN

Saat ini benar-benar terdapat kemajuan teknologi penghitungan fiksasi N_2 , terutama dalam pengestabilisan pengetahuan yang lebih baik dari pembatas terhadap beberapa teknik yang digunakan (diringkas pada Tabel 7.1.; dihalaman sebaliknya). Dalam rangka mendapatkan estimasi fiksasi N_2 di lapang yang akurat, berbagai pembatas harus diketahui dan prosedur yang digunakan apakah untuk mengurangi pengaruh berbagai pembatas atau untuk memeriksa kepentingan relatif pada kalkulasi aktivitas simbiosis. Hal ini benar bila pemilihan metoda dibatasi oleh faktor-faktor teknik, lingkungan dan kultur tanaman. Idealnya, penghitungan fiksasi N_2 harus dihubungkan dengan kandungan N mineral, dan pembentukan bintil akar tanaman. Studi sebaiknya juga dihubungkan dengan penelitian transfer N atau pengaruh tanaman berikutnya apabila estimasi nilai fiksasi N_2 keseluruhan akan diperoleh. Akhirnya, metodologi harus dipilih untuk tujuan umum studi yang ringan. Teknik-teknik yang maju dan terperinci mungkin tidak sesuai apabila hanya diperlukan penentuan kualitatif dan komparatif.

Tabel 7.1. Ringkasan dari keuntungan dan pembatas dari berbagai metoda estimasi fiksasi N₂ oleh leguminosa di lapang^a.

Keuntungan	Pembatas
Metoda Solute-N	
<ul style="list-style-type: none"> - Tidak mahal - Sederhana - Analisis dilakukan dengan rangkaian kalorimeter sederhana - Pengrusakan secara total tidak diperlukan - Dimungkinkan untuk dikerjakan berdasarkan pada individu tanaman - Menduga tanaman yang tergantung pada N₂ atmosfer dan N tanah 	<ul style="list-style-type: none"> - Tidak langsung (kalibrasi harus stabilis dengan keberadaan tanaman pemfiksasi N₂) - Estimasi waktu pendek - Tidak dapat digunakan untuk perbandingan tanpa kalibrasi setiap species - Kalibrasi pada beberapa species mungkin dipengaruhi oleh fase-fase perkembangan - Tidak dapat digunakan pada penghasil amida
Metoda Perbedaan-N	
<ul style="list-style-type: none"> - Langsung - Relatif sederhana - Mengatur N yang diperoleh dari tanah 	<ul style="list-style-type: none"> - Memerlukan tanaman referensi bukan pemfiksasi N₂ yang sesuai - Leguminosa dan tanaman referensi harus menyerap N tanah dalam jumlah yang sama
Teknik pelarutan Isotop	
<ul style="list-style-type: none"> - Langsung - Memberikan waktu estimasi fiksasi N₂ yang tidak berbeda - Menduga tanaman yang tergantung pada N₂ atmosfer dan N tanah 	<ul style="list-style-type: none"> - Memerlukan tanaman referensi bukan pemfiksasi N₂ yang sesuai
(a) Metoda pengkayaan ¹⁵N	
<ul style="list-style-type: none"> - Kemungkinan besar akurat 	<ul style="list-style-type: none"> - Peralatan dan material yang diperkaya ¹⁵N mahal - Memerlukan perubahan senyawa yang diperkaya ¹⁵N - Leguminosa dan tanaman referensi harus menyerap jumlah N relatif dari tanah dan penambahan ¹⁵N yang sama - Pengkayaan ¹⁵N dari N tanah tersedia bagi tanaman dapat berubah dengan kedalaman dan waktu
(b) Metoda kelimpahan ¹⁵N alam	
<ul style="list-style-type: none"> - Tidak memerlukan penambahan ¹⁵N - δ ¹⁵N dari N tanah tersedia bagi tanaman mungkin relatif tetap dengan kedalaman dan waktu - pemilihan tanaman referensi mungkin kurang penting daripada studi pengkayaan ¹⁵N 	<ul style="list-style-type: none"> - Memerlukan spektrometer massa yang tepat dan prosedur analitik yang sangat teliti - Tidak sensitif jika δ ¹⁵N (tanah) mendekati δ ¹⁵N (udara) - Pada beberapa kasus variabilitas mungkin besar - Sebaiknya membiarkan penggabungan fraksi isotop selama fiksasi N₂

Diadaptasi dari Ledgard dan Peoples (1988)

DAFTAR PUSTAKA

- Bergersen, F.J., 1980. Measurement of nitrogen fixation by direct means. In : Bergersen, F.J. ed., Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Chichester, UK. John Wiley and Sons, 65-110.
- Bergersen, F.J., 1988. Natural ^{15}N abundance methods for N_2 -fixation measurement. In : Shamsuddin, Z.H., Othman, W.M.W., Mariziah, M. and Sundram, J., ed., Biotechnology of nitrogen fixation in the tropics. Serdang, Malaysia, Universiti Pertanian Malaysia, 137-144.
- Bergersen, F.J., and Turner, G.L. 1983. An evaluation of ^{15}N methods for estimating nitrogen fixation in a subterranean clover-perennial rye grass sward. Australian Journal of Agricultural Research 34, 391-401.
- Bergersen, F.J., Brockwell, J., Gault, R.R., Morthorpe, L. Peoples, M.B., and Turner, G. L. 1989. Effects of available soil nitrogen and rates of inoculation on nitrogen fixation by irrigated soybeans and evaluation of ^{15}N methods for measurement. Australian Journal of Agricultural Research 40, in press.
- Bergersen, F.J., Peoples, M.B., and Turner, G. L. 1988. Isotopic discriminations during the accumulation of nitrogen by soybean. Australian Journal of Plant Physiology 15, 407-420.
- Bergersen, F.J., Turner, G. L., Amarger, N., Mariotti, F., and Mariotti, A. 1986. Strain of *Rhizobium lupini* determines natural abundance of ^{15}N in root nodules of *Lupinus* spp. Soil Biology and Biochemistry 18, 97-101.
- Boddey, R.M. 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Gramineae. CRC Critical Reviews in Plant Sciences 6, 209-266.
- Boddey, R.M., Chalk, P.M., Victoria, R.L., and Matsui, E. 1984. Nitrogen fixation by nodulated soybean under tropical field conditions estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. Soil Biology and Biochemistry 16, 583-588.
- Brockwell, J. 1980. Experiments with crop and pasture legumes-principles and practice. In Bergersen, F.J., ed. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Chichester, UK. John Wiley and Sons, 417-488.

- Brockwell, J., Roughley, R.J., and Herridge, D.F. 1987.** Population dynamics of *Rhizobium japonicum* strains used to inoculate three successive crops of soybean. *Australian Journal of Agricultural Research* 38, 61-74.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., and Youngs, V.L. 1975.** Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications of Soil Science and Plant Analysis* 6, 71-80.
- Chalk, P.M. 1985.** Estimation of N₂ fixation by isotope dilution; an appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their applications. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 389-410.
- Corbin, E.J., Brockwell, J., and Gault, R.R. 1977.** Nodulation studies on chickpea (*Cicer arietinum*). *Australian Journal of experimental Agriculture and Animal Husbandry* 17, 126-134.
- Cornet, F., Otto, C., Rinaudo, G., Diem, H.G., and Dommergues, Y., 1985.** Nitrogen fixation by *Acacia holosericea* grown in field-simulating conditions. *Acta Oecologia/Oecologia Plantarum* 6, 211-218.
- Danso, S.K.A. 1988.** The use of ¹⁵N enriched fertilizers for estimating nitrogen fixation in grain and pasture legumes. In : Beck, D.P., and Materon, L.A. ed. *Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture*. Dordrecht, Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers, 345-358.
- Danso, S.K.A., Hardarson, G., and Zapata, F. 1988.** Dinitrogen fixation estimates in alfalfa-ryegrass swards using different nitrogen-15 labeling methods. *Crop Science* 28, 106-110.
- Evans, J., and Taylor, A.C. 1987.** Estimating dinitrogen (N₂) fixation and soil accretion of nitrogen by grain legumes. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 53, 78-82.
- Evans, J., Turner, G.L., O'Connor, G.E., and Bergersen, F.J. 1987.** Nitrogen fixation and accretion of soil nitrogen by field-grown lupins (*Lupinus angustifolius*). *Field Crops Research* 16, 309-322.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T., and Pennington, J.S. 1971.** Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11, 929-931.
- Fiedler, R. 1984.** The measurement of ¹⁵N. In : L'Annunziata, M.F., and Legg, J.O., ed., *Isotopes and radiation in agricultural sciences*. Volume 1. *Soil-plant-water relationships*. London, United Kingdom. Academic Press, 223-282.

- Fried, M., and Broeshart, H., 1975. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant and Soil* 43, 707-711.
- Gault, R.R., Chase, D.L., and Brockwell, J. 1982. Effects of spray inoculation equipment on the viability of *Rhizobium* spp. in liquid inoculants for legumes. *Australian Journal of experimental Agriculture and Animal Husbandry* 22, 299-309.
- Gault, R.R., Chase, D.L., Banks, L.W. and Brockwell, J. 1984. Remedial measures to salvage unnodulated soybean crops. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 50, 244-246.
- Gibson, A.H. 1980. Methods for legumes in glasshouse and controlled environment cabinets. In : Bergersen, F.J., ed., *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Chichester, UK. John Wiley and Sons, 139-184.
- Giller, K.E., and Witty, J.F. 1987. Immobilized ^{15}N -fertilizer sources improve the accuracy of field estimates of N_2 -fixation by isotope dilution. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 459-463.
- Hansen, A.P. and Pate, J.S. 1987. Evaluation of the ^{15}N natural abundance method and xylem sap analysis for assessing N_2 fixation of understorey legumes in Jarrah (*Eucalyptus amrginata* Donn ex Sm.) forest in S.W. Australia. *Journal of Experimental Botany* 38, 1446-1458.
- Hauck, R.D., and Weaver, R.D., ed. 1986. Field measurements of dinitrogen fixation and denitrification. SSSA Special Publication No. 18, Madison, USA. Soil Science Society of America, Incorporated, 115p.
- Herridge, D.F. 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiology* 70, 1-6.
- Herridge, D.F. 1984. Effects of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root-bleeding and vacuum extracted exudates of soybean. *Crop Science* 25, 173-179.
- Herridge, D.F. 1988. The narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as a nitrogen-fixing rotation crop for cereal production. 1. Indices of nitrogen fixation. *Australian Journal of Agricultural Research* 39, 1003-1015.
- Herridge, D.F., and Doyle, A.D. 1988. The narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as a nitrogen-fixing rotation crop for cereal production. 2. Indices of nitrogen fixation. *Australian Journal of Agricultural Research* 39, 1017-1028.

- Herridge, D.F., O'Connell, P., and Donnelly, K. 1988. The xylem ureide assay of nitrogen fixation : sampling procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 39, 12-22.
- Herridge, D.F., Roughley, R.J., and Brockwell, J. 1984. Effects of rhizobia and soil nitrate on the establishment and functioning of the soybean symbiosis in the field. *Australian Journal of Agricultural Research* 35, 149-161.
- Hunt, P.G., Burnham, K.P., and Matheny, T.A. 1987. Precision and bias of various soybean dry matter sampling techniques. *Agronomy Journal* 79, 425-428.
- Ledgard, S.F., and Peoples, M.B. 1988. Measurement of nitrogen fixation in the field. In : Wilson, J.R., ed., *Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems*. Wallingford, UK, C.A.B. International, 351-367.
- Ledgard, S.F., Freney, J.R., and Simpson, J.R. 1984. Variations in natural abundance of ^{15}N in the profiles of some Australian pasture soils. *Australian Journal of Soil Research* 22, 155-164.
- Ledgard, S.F., Morton, R., Freney, J.R., Bergersen, F.J., and Simpson, J.R. 1985. Assessment of the relative uptake of added and indigenous soil nitrogen by nodulated legumes and reference plants in the ^{15}N dilution measurement of N_2 fixation : derivation of method. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 317-321.
- Mariotti, A.J., Mariotti, F., and Amarger, N. 1983. Use of natural ^{15}N abundance in the measurement of symbiotic fixation. In : *nuclear techniques in improving pasture management*. Vienna, Austria. International Atomic Energy Agency, 61-77.
- Nair, P.K.R. 1988. Use of perennial legumes in Asian Farming systems. In : *Sustainable agriculture : green manure in rice farming*. Los Banos, Philippines. International Rice Research Institute 301-317.
- Neves, M.C.P., Didonet., Dugue, F.F., and Dobereiner, J. 1985. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *Journal of Experimental Botany* 36, 1179-1192.
- Norhayati, M., Mohd Noor, S., Chong, K., Faizah, A.W., Herridge, D.F., Peoples, M.B., and Bergersen, F.J. 1988. Adaptation of methods for evaluating N_2 fixation in food legumes and legume cover crops. *Plant and Soil* 108, 143-150.
- O'hara, G.W., Boonkerd, N., and Dilworth, M.J. 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil* 108, 93-110.
- Pate, J.S., Atkins, C.A., White, S.T., Rainbird, R.M., and Woo, K.C. 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiology* 65, 961-965.

- Patterson, T.G., and La Rue, T.A. 1983. N₂ fixation (C₂H₂) and ureide content of soybeans : ureides as an index of fixation. *Crop Science* 23, 825-831.
- Peoples, M.B., Bergersen, F.J., Herridge, D.F., Sudin, M.N., Faizah, A.W., Chong, K., and Norhayati, M. 1988a. Estimation of nitrogen fixation in legumes in the tropics by xylem sap analysis. In : Shamsuddin, Z.H., Othman, W.M.W., Marziah, M., and Sundram, J., ed., *Biotechnology of nitrogen fixation in the tropics*. Serdang, Malaysia, Universiti Pertanian Malaysia, 117-126.
- Peoples, M.B., Hebb, D.M., Gibson, A.H., and Herridge, D.F. 1989. Development of the xylem ureide assay or the measurement of nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Journal of Experimental Botany*, 40, in press.
- Peoples, M.B., Herridge, D.F., and Gibson, A.H. 1988b. Measurement of nitrogen fixation in crop and shrub legumes. In : *Sustainable agriculture : green manure in rice farming*. Los Banos, Philippines, International Rice Research Institute, 223-237.
- Peoples, M.B., Pate, J.S., Atkins, C.A., and Bergersen, F.J. 1986. Nitrogen nutrition and xylem sap composition of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv. Virginia Bunch). *Plant Physiology* 82, 946-951.
- Peoples, M.B., Sudin, M.N., and Herridge, D.F. 1987. Translocation of nitrogenous compounds in symbiotic and nitrate-fed amide-exporting legumes. *Journal of Experimental Botany* 38, 567-579.
- Reichardt, K., Hardason, G., Zapata, F., Kirda, C., and Danso, S.K.A. 1987. Site variability effects on field measurement of symbiotic nitrogen fixation using the ¹⁵N isotope dilution method. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 405-409.
- Rennie, R.J. 1986. Comparison of methods of enriching a soil with nitrogen-15 to estimate dinitrogen fixation by isotope dilution. *Agronomy Journal* 78, 158-163.
- Rerkasem, B., Rerkasem, K., Peoples, M.B., Herridge, D.F., and Bergersen, F.J. 1988. Measurement of N₂ fixation in maize (*Zea mays* L.) – ricebean (*Vigna umbellata* [Thunb.] Ohwi and Ohashi) intercrops. *Plant and Soil* 108, 125-135.
- Sanchez, C.A., Blackmer, A.M., Horton, R. and Timmons, D.R. 1987. Assessment of errors associated with plot size lateral movement of nitrogen-15 when studying fertilizer recovery under field conditions. *Soil Science* 144, 344-351.
- Shearer, G., and Kohl, D.H. 1986. N₂-fixation in field settings : estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology* 13, 699-756.

- Smith, C.J., Whitfield, D.M., and Gyles, O.A. 1989.** Estimation of available N status of soil by wheat and barley : A-values. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 169-172.
- Somasegaran, P., and Hoben, H. 1985.** Methods in legume/*Rhizobium* technology. Paia, USA, University of Hawaii, NifTAL Project, 367p.
- Steele, K.W. 1983.** Quantitative measurements of N turnover in pasture systems with particular reference to role of ^{15}N . In : Nuclear techniques in improving pasture management. Vienna, Austria, International Atomic Agency, 17-35.
- Thomas, R.J., McPherson, J.R., Schrader, L.E., and Bliss, F.A. 1984.** Composition of bleeding sap nitrogen from lines of field-grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* 79, 77-88.
- Thompson, J.A. 1980.** Production and quality control of legume inoculants. In : Bergersen, F.J., ed., Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Chichester, UK, John Wiley and Sons, 489-533.
- van Berkum, P., Sloger, C., Weber, D.F., Cregan, P.B. and Keyser, H.H. 1985.** Relationship between ureide N and N_2 fixation, above ground N accumulation, acetylene reduction, and nodule mass in greenhouse and field studies with *Glycine max* L. (Merr). *Plant Physiology* 77, 53-58.
- van Kessel, C., Roskoski, J.P., and Keane, K 1988.** Ureide production by N_2 -fixing and non- N_2 -fixing leguminous trees. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 891-897.
- Vincent, J.M., ed. 1982.** Nitrogen fixation in legumes. Sydney, Australia. Academic Press, 228p.
- Wagner, G.H., and Zapata, F. 1982.** Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. *Agronomy Journal* 74, 607-612.
- Westfall, D.G. Henson, M.A., and Evans, E.P. 1978.** The effects of soil sample handling between collection and drying on nitrate concentration. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 9, 169-185.
- Witty, J.F. 1983.** Estimating N_2 -fixation in the field using ^{15}N labeled fertilizer : some problems and solutions. *Soil Biology and Biochemistry* 15, 631-639.
- Witty, J.F. and Minchin, F.R. 1988.** Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay ; myths and mysteries. In : Beck, D.P., and Materon, L.A., ed., Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture. Dordrecht, Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers 331-344.

- Witty, J.F., Rennie, R.J., and Atkins, C.A. 1988.** ^{15}N addition methods for assessing N_2 fixation under field conditions. In : Summerfield, R.J., ed., World crops : cool season food legumes. Dordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers 716-730.
- Wynne, J.C., Bliss, F.A., and Rosas, J.C. 1987.** Principles and practice of field design to evaluate symbiotic nitrogen fixation. In : Elkan, G.H., ed., Symbiotic nitrogen fixation technology. New York, USA, Marcel Dekker, Inc., 371-389.
- Yemm, E.W., and Cocking, E.F. 1955.** The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst 80, 209-213.
- Young, E.G., and Conway, C.F. 1942.** On the estimation of allantoin by the rimini-schryver reaction. Journal of Biological Chemistry 142, 839-853.

UCAPAN TERIMAKASIH

Sebagian dari informasi yang dilaporkan pada publikasi ini diperoleh dari program penelitian yang didukung oleh Pusat Penelitian Pertanian Internasional Australia (Proyek No. 8305 – Perkembangan Evaluasi metoda untuk menghitung fiksasi nitrogen secara biologis, dan Proyek No. 8800 – Penghitungan fiksasi nitrogen pada sistem produksi leguminosa). Penulis sangat berhutang budi pada Brockwell dan R.R. Gault (bagian Industri Tanaman CSRIO) untuk nasihat dan banyak diskusi yang bermanfaat, dan menyatakan terimakasih banyak atas persiapan naskah yang cermat oleh Pusat Pemrosesan Data, bagian Industri Tanaman).

LAMPIRAN

10.1. Sumber-sumber strain rhizobium

Sumber plasma benih rhizobium NifTAL adalah koleksi rhizobium yang luas untuk banyak leguminosa (tropika dan subtropika) dan dipelihara pada proyek NifTAL. Permohonan strain-strain yang sesuai tulis ke : Kepala sumber plasma benih rhizobium, Universitas Hawaii, Proyek NifTAL dan MIRCEN, PO. Box 0, Paia, Hawaii 96779, USA.

Juga terdapat laboratorium/ lembaga lain yang memelihara koleksi *Rhizobium* :

Dr Carlos Batthyany
Nitrosil, Florida 622, 4 Piso,
Buenos Aires,
Argentina

Rhizobia untuk leguminosa
tropika

Dr R.J. Roughley
Australian Inoculants Research
and Control Service
Horticultural Research Station
Gosford, NSW 2250
Australia

Strain-strain AIRCS

Dr R.A. Date
CSIRO Division of Tropical Crops
and Pasture
Mill Road, St Lucia, Queensland
4067 Australia

Rhizobia untuk leguminosa
tropika

Mr. J. Brockwell
Microbiology Section
CSIRO Division of Plant Industry
Canberra, ACT 2600

Rhizobia untuk clover, medics,
dan species subtropika lain.

Professor J.R. Jardin Friere
Rhizobium MIRCEN, IPAGRO
Caixa Postal 776
90000 Porto Alegre, Rio Grande Do
Sul Brazil

Rhizobia untuk leguminosa
tropika

Dr D.J. Hume
Crop Science Department
University of Guelph
Guelph, Ontario NiG 2W1
Canada

Rhizobia untuk pea, lupin,
alfalfa dan soybean

Dr J. Day
Soil Microbiology Department
Rothamsted Experimental Station
Harpenden, Herts A15 2JQ
UK

Rhizobia untuk clover, alfalfa,
pea, beans, dan leguminosa
subtropika lainnya

Plant Diseases Division
DSIR, Private Bag, Auckland
New Zealand

Rhizobia untuk clover, alfalfa
dan lupin

Dr D.F. Weber
ISDA CCNFL
Building 001, Room 309 BARC-W
Beltsville, MD 20705
USA

Rhizobia untuk leguminosa
subtropika

Alamat lembaga-lembaga yang memiliki koleksi rhizobium lebih lanjut dapat ditemukan dalam : Skinner, F.A., Hamatova, E., dan McGowan, V.F., 1983. Dalam katalog koleksi rhizobium dunia mikroorganisme dunia pada Universitas Queensland, Brisbane, Australia.

10.2. Penghasil inokulan Australia

Tiga dari semua perusahaan yang terdaftar di bawah dapat mensuplai inokulan untuk sebagian besar leguminosa.

Australian Laboratories Pty Ltd
PO Box 8
Regents Park, NSW 2143

Root-nodule Pty Ltd
84 Rawson Road
Woy Woy, NSW 2256

Inoculant Services
"Teangi"
Bethanga, Vic. 3691