

## FRAKSIONASI NITROGEN ORGANIK PADA TANAH DI PERKEBUNAN KAKAO

Oleh :

**Tulus Fernando Silitonga**  
Dosen Fakultas Pertanian Universitas Quality

### Abstract

*Potential of organic in soil is quite large so that it can be used as an indicator in determination of soil nitrogen need by cocoa plants. In Indonesia, the study of soil organic nitrogen especially of cocoa plantations is very limited. If we understand and know several fractions of organic nitrogen and its content in soil, it can be predicted for its availability for cocoa plants. Further, it can be used as an indicator in fertilizer recommendation. Research of laboratory analysis showed that soil in those cocoa plantations had quite high organic nitrogen contents in form of nitrogen fraction as total hydrolysable-N (52.461 ppm). This research showed that, there were unknown-N fraction (50.978 ppm), fraction of non hydrolyzable-N (15.738 ppm), fraction of ammonium-N hydrolysable (930 ppm), amino acid-N (354 ppm), and the least is fraction of amino sugar (198 ppm).*

**Keywords:** *Cocoa, soil, nitrogen organic, hydrolyzable N*

### I. Pendahuluan

Di dalam tanah senyawa nitrogen organik tersusun dalam senyawa protein, asam nukleat dan dalam bahan penyusun dinding sel mikrobia tanah. Hasil hidrolisis dari senyawa tersebut lebih dari separuhnya akan dibebaskan sebagai asam-asam amino dan zat gula amin. Nitrogen yang terikat dalam asam amino mencapai 30-40% dari total N dalam tanah. Asam amino yang ada dalam keadaan bebas akan cepat terurai jika dibandingkan dengan asam amino yang membentuk senyawa kompleks dengan senyawa organik lain seperti yang terdapat dalam zat gula amin. Oleh karena itu pada tanah yang dikelola secara intensif, kadar asam amino bebas cenderung menurun sedangkan kadar zat gula amin relatif konstan. Hal ini menunjukkan bahwa kontribusi zat gula amin dalam mineralisasi N sangat kecil (Ma'shum *et al.*, 2003).

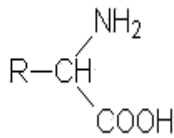
#### Nitrogen Terhidrolisis (Hydrolyzable N)

Nitrogen organik (hydrolyzable-N) akan menghasilkan bentuk nitrogen organik seperti N-amonium, N-(amonium + gula amin), N-

asam amino, N-(amonium + gula amin + asam amino), dan fraksi N-tidak diketahui (unknown-N). Dari beberapa bentuk nitrogen organik tersebut, bentuk N-gula amin dapat diketahui melalui hasil pengurangan N-(amonium + gula Amin) - N-amonium. Sebaliknya kandungan N-asam amino dapat diketahui melalui hasil pengurangan N-(amonium + gula amin + asam amino) dengan (amonium + gula amin)-N (Khan *et al.*, 2001)

#### N-Asam Amino (Amino Acid-N)

Menurut McDonald *et al.* (2002) asam-asam amino dihasilkan bila protein dihidrolisa dengan enzim-enzim, asam-asam atau alkali-alkali, dan hanya 20 asam amino yang umumnya dijumpai sebagai komponen protein. Selanjutnya asam amino ditandai dengan adanya suatu gugus asam amino (-NH<sub>2</sub>) dan suatu unit karboksil (-COOH), gugus amino terikat pada atom C yang berdekatan dengan gugus karboksil dengan formula umum:



Gambar 1. Formula umum senyawa N-asam amino

Menurut Bremner (1950), beberapa bentuk protein di dalam tanah dapat dipecah menjadi bentuk yang sederhana. Bentuk sederhana dari protein berupa asam amino yang terdiri atas beberapa jenis, seperti *phenylalanine*, *leucine*, *valine*, *alanine*, *glycine*, *threonine*, *serine*, *glutamic acid*, *aspartic acid*,  $\alpha$ -*diaminopimelic acid*, *lysine*, *arginine*, *sulphoxide of methionine*, *histidine*, *tyrosine*, *proline*, *hydroxyproline*,  $\alpha$ -*Amino-n-butyric acid*,  $\beta$ -*Alanine*,  $\gamma$ -*aminobutyric acid*.

Dari beberapa bentuk asam amino tersebut, beberapa telah diketahui asal dan sumber pembentukannya, antara lain  $\alpha$ -*Amino-n-butyric acid*,  $\beta$ -*Alanine*, dan  $\gamma$ -*aminobutyric acid* berasal dari pembusukan tanaman, hewan, dan bakteri pengurai. Sedangkan bentuk  $\alpha$ -*diaminopimelic acid* berasal dari dinding sel bakteri *Corynebacterium diphtheriae* akibat adanya aktivitas metabolisme di dalam tubuh bakteri tersebut (Bremner, 1950).

Sedangkan menurut Stevenson (1994), asam amino di dalam tanah berasal dari beberapa sumber, seperti (1) aktivitas biologi tanah (sisa tanaman, hewan, dan biota tanah), (2) pelepasan saat terjadi konversi protein-N menjadi  $\text{NH}_3$  (protein)  $\rightarrow$  peptida  $\rightarrow$  asam amino  $\rightarrow$   $\text{NH}_3$  oleh organisme heterotrof dan (3) sisa pembuangan tanaman atau mikrobia tanah.

Proses dekomposisi protein diawali dengan proses degradasi yang dikatalis oleh proteinase membentuk unit-unit yang lebih kecil berupa rangkaian peptida. Selanjutnya peptida-peptida tersebut diubah ke dalam bentuk asam-asam amino dengan peptidase sebagai bahan dasar penyusunnya. Enzim-enzim tersebut dihasilkan oleh sejumlah mikroba heterotrof dan setiap jenis mikroba hanya bertanggung jawab pada satu atau beberapa reaksi. Tahap selanjutnya, asam amino yang telah dihasilkan akan diuraikan lebih lanjut ke derivat (turunan) tertentu dan diikuti dengan pembebasan  $\text{NH}_3$ . Enzim penting yang sangat berpengaruh pada proses

ini adalah deaminase. Amina dan beberapa asam amino yang dibebaskan dimanfaatkan oleh bakteri heterotrof yang lain dan selanjutnya akan dihasilkan amonium

Protein dan beberapa senyawa sejenisnya di dalam tanah akan pecah dan berubah menjadi bentuk asam amino. Kecepatan pemecahan protein tersebut tergantung pada keadaan lingkungan seperti pH, kelembapan, temperatur, dan populasi mikroorganisme tanah. Bakteri, fungi, dan mikroorganisme lain ikut berperan dalam proses dekomposisi yang menggabungkan sebagian nitrogen ke dalam jaringan tubuhnya sendiri sebagai hasil penghancuran. Sebagian protein dapat bergabung dengan lignin dan senyawa lain yang tahan terhadap dekomposisi dan menjadi bagian dari humus tanah. Asam amino yang terbentuk dapat dihidrolisis menjadi  $\text{CO}_2$ , senyawa amonium ( $\text{NH}_4^+$ -N) dan hasil yang lain.

#### N-Gula Amin (Amino Sugar-N)

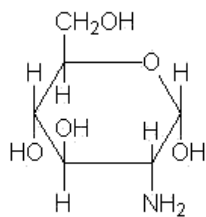
Senyawa gula amin merupakan senyawa N-organik penyusun dinding sel bakteri dan dinding sel fungi. Dinding sel bakteri tersusun atas peptidoglycan, yaitu senyawa N-organik yang tersusun atas rangkaian N-asetilglokosamin dan asam N-asetilmuramat melalui ikatan b(1-4) yang dihubungkan dengan sejumlah asam-asam amino (L-alanin, asam D-glutamat, asam mesodiaminopimelat, D-alanin) melalui ikatan peptida. Senyawa-senyawa tersebut memiliki kandungan N dengan nisbi tinggi dan konstan, sehingga bakteri memiliki nisbah C/N yang rendah, lebih rendah dari nisbah C/N fungi (Ma'shum *et al.*, 2003).

Di dalam tanah senyawa gula amin merupakan senyawa N-organik yang bersifat lambat terurai (*inert*) dan merupakan indikator utama pada pembentukan bahan organik tanah. Penguraian senyawa N-gula amin untuk menghasilkan  $\text{NH}_3$  dilakukan oleh mikrobia, dengan melibatkan beberapa enzim (Ma'shum *et al.*, 2003).

N-gula amin merupakan bentuk nitrogen organik (*hydrolyzable-N*) yang dapat dipisahkan melalui hidrolisis asam. N-gula amin di dalam tanah berasal dari berbagai substansi mikrobia tanah, seperti bakteri dan fungi. Pada dinding sel bakteri terkandung peptidoglycan yang merupakan bahan dasar

penyusun glukosa. Bentuk N-gula amin yang dihasilkan berupa N-asetilglokosamin dan N-asetilmuramat (MurAc). Peptidoglycan hanya dihasilkan oleh bakteri prokariota, namun bakteri eukariota tidak menghasilkan bahan penyusun glukosa tersebut. Fungi menghasilkan bentuk gula amin berupa glucosamine (GlcN) dan galactosamine (GalN) (Cochran dan Vercellotti, 1978).

Secara umum, bentuk gula amino-N dapat digambarkan sebagai formula berikut:



Gambar 2. Formula umum senyawa N-gula amin

Menurut Khan *et al* (2001) N-gula amin di dalam tanah menunjukkan aktivitas mikrobia di dalam tanah, jumlah mikroba, dan asal dari mikroba tersebut. Oleh karena itu, kandungan N-gula amin di dalam tanah secara langsung akan membantu pertumbuhan mikroba tanah (biologis), dan berdampak secara nyata terhadap laju mineralisasi N akibat adanya dekomposisi oleh mikroba tersebut (biokimia). Semakin banyak jumlah mikroba tanah, maka laju dekomposisi tanah akan semakin cepat dan produksi N-gula amin semakin besar. Tanah yang telah mengalami dekomposisi secara baik akan mampu memberi kebutuhan nitrogen terhadap pertumbuhan tanaman.

Konsentrasi N-gula amin tertinggi pada umumnya terdapat pada tanah dengan tekstur lempung, dengan asumsi terdapat jumlah mikrobia yang banyak dan dekomposisi bahan organik telah terjadi secara sempurna (Khan *et al.*, 2001).

#### N-Tidak Diketahui (Unknown-N)

Nitrogen berupa N-tidak diketahui merupakan bentuk yang tidak dapat diketahui bentuk organiknya karena tidak dapat dipisahkan melalui hidrolisis asam. Fraksi N-tidak diketahui mengandung non- $\alpha$  amino-N dan hexosamine (asam amino kompleks). N-

tidak diketahui (unknown-N) tidak dapat dipisahkan melalui hidrolisis asam karena bentuk organiknya yang tidak dapat larut di dalam kondisi asam. Namun senyawa N-tidak diketahui (unknown-N) dapat larut di dalam senyawa basa yang dilakukan melalui hidrolisis basa sehingga dapat diketahui bentuk organik dan senyawa yang dihasilkan (Greenfield, 2001).

Untuk mengetahui berapa besar jumlah N-tidak diketahui (unknown-N) yang ada dalam tanah melalui hidrolisis asam, dapat dilakukan pengurangan dari N-total terhidrolisis (hydrolyzable-N) - (amonium + gula amin + asam amino)-N. Namun jumlah unknown-N tidak menunjukkan senyawa organik apa yang dihasilkan melalui hidrolisis asam tersebut.

#### N-Total Terhidrolisis (Total Hydrolyzable-N)

N-total terhidrolisis (total hydrolyzable-N) merupakan resultan dari N-amonium + N-asam amino + N-gula amin + N-tidak diketahui. N-total terhidrolisis menunjukkan besar kandungan fraksi N-organik yang dapat dihidrolisis dari N-total tanah dengan menggunakan asam HCL 6M pada suhu 120°C dan destruksi pada suhu 350°C (Benito, komunikasi pribadi).

#### N-Tidak Terhidrolisis (Non Hydrolyzable-N)

N-tidak terhidrolisis (non hydrolyzable-N) merupakan bentuk nitrogen organik yang tidak dapat dipisahkan melalui hidrolisis asam basa. Hal ini diakibatkan karena bentuk nitrogen organik tersebut sangat lekat terhadap fraksi tanah (Benito, komunikasi pribadi). Sehingga metode pemisahannya tidak dapat dilakukan dengan hidrolisis asam dengan suhu 120°C. Untuk mengetahui kandungan N-tidak terhidrolisis (non hydrolyzable-N) di dalam tanah, dapat diukur menggunakan alat NMR dan ANCA-MS (analyzer-mass spectrometry). Alat tersebut dapat digunakan untuk membaca bentuk nitrogen organik melalui analisis (analyzer), seperti isotop  $^{15}\text{N}$  (Khan *et al.*, 1998).

Dalam pengukuran non hydrolyzable-N pada penelitian ini, hanya memakai metode pengurangan dari N-total tanah - N-total terhidrolisis. Melalui metode pengukuran tersebut dapat diketahui kisaran dari kandungan nitrogen organik yang tidak dapat dihidrolisis di dalam tanah.

**II. Bahan Dan Metode**

Dalam menyiapkan hidrolisat, di ambil 5 g sampel tanah kering angin 100 mes dan diletakkan di dalam tabung digest. Kemudian ditambahkan 20 mL 6M HCl, 2 tetes oktil alkohol (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O) ke dalam tabung digest. Tabung digest tersebut diletakkan di dalam oil batch dan dipanaskan pada suhu 110-120<sup>0</sup>C selama 12 jam dengan menggunakan paravin sebagai media pengantar panas. Setelah dipanaskan selama 12 jam, tabung digest diangkat, ditiriskan dari paravin, dan didinginkan sampai suhu kamar. Hidrolisat yang terdapat di dalam tabung digest dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan disaring

menggunakan Whatman No.50. Hidrolisat yang telah disaring tersebut diencerkan sampai volume 50 mL. Setiap dilakukan pengukuran nitrogen organik, hidrolisat dinetralkan pada pH 6.5-6.8 dengan menggunakan 5M NaOH.

**Analisis N-Organik (Stevenson, 1996)**

Menurut Stevenson (1996) untuk mengukur bentuk nitrogen organik di dalam tanah melalui hidrolisis nitrogen organik sehingga menghasilkan bentuk nitrogen yang lebih sederhana seperti N-amonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), N-asam amino (amino acid-N), dan N-total terhidrolisis (total hydrolyzable-N), dapat menggunakan metode destilasi (methods of steam distillation), seperti tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Metode analisis nitrogen organik

Bentuk N-Organik	Metode Analisis*
N-amonium	Destilasi dengan MgO
N-asam amino	Destilasi dengan penambahan phosphate-borate setelah dilakukan pemanasan (hidrolisis) 100 <sup>0</sup> C menggunakan NaOH untuk membuang bentuk (gula amin + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )-N dan memakai ninhidrin untuk merubah bentuk α-amino-N menjadi bentuk NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .
N-gula amin	Destilasi dengan penambahan phosphate-borate pada pH 11.2
N-total terhidrolisis (total hydrolyzable-N)	Destilasi dengan NaOH setelah dilakukan destruksi Kjeldahl menggunakan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> dan katalis campur K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
N-tidak terhidrolisis (non hydrolyzable-N)	Merupakan hasil dari (N total) – (N total terhidrolisis)
N-tidak diketahui (unknown-N)	Merupakan hasil dari (N total terhidrolisis) - ( NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + N-gula amino + N-asam amino)

Keterangan :\* Dalam metode analisis, bentuk NH<sub>3</sub> dibebaskan melalui destilasi dan ditangkap oleh indikator H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> serta diukur oleh titrasi dengan 1N HCL

IV. Hasil Dan Pembahasan

Tabel 2. Kandungan nitrogen organik (ppm N)

NO	Jenis Tanah	Affdeling	NH <sub>4</sub> -N	N-Gula Amin	N-Asam Amino	N-Tdk Dketahui	N-Tdk Terhidrolisis	N-Total Terhidrolisis	N Total Tanah
1	Alluvial	Sbr. Bopong	24.50	3.40	12.15	1096.52	263.42	1136.58	1400
2	Alluvial	Trate	29.98	10.04	8.75	1134.48	616.76	1183.24	1800
3	Alluvial	Aluvial L 25	24.77	1.83	3.94	1635.08	134.37	1665.63	1800
4	Alluvial	Mumbul	25.06	1.98	5.08	1478.59	189.28	1510.72	1700
5	Mediteran Merah Kuning	Sungai Lembu	18.94	17.51	13.58	1313.69	336.28	1363.72	1700
6	Mediteran Merah Kuning	Sumber Jambe	37.62	3.72	2.72	1145.60	210.34	1189.66	1400
7	Mediteran Merah Kuning	PAL IV/VI	42.63	1.51	5.46	764.27	886.12	813.88	1700
8	Mediteran Merah Kuning	Sumber Gandeng	25.51	1.25	7.67	1157.58	307.99	1192.01	1500
9	Regosol	Kl. Sepanjang	18.86	10.90	4.23	3247.82	318.19	3281.81	3600
10	Regosol	Kl. Takir	23.93	8.06	10.85	2304.18	1152.99	2347.01	3500
11	Regosol	Afd. Besar	24.14	6.81	8.00	1832.51	1028.54	1871.46	2900
12	Regosol	KS. Darungan 79	9.55	15.18	17.88	2651.24	106.15	2693.85	2800
13	Regosol	Kajar SPCT I	22.14	13.18	0.65	2241.46	222.56	2277.44	2500
14	Regosol	Kacangan SPCT II	33.21	6.61	3.71	1532.86	1023.61	1576.39	2600
15	Regosol	Sumber Baru SPCT I	21.41	4.55	5.39	2486.36	82.30	2517.70	2600
16	Regosol	Afd. Gareng rejo	34.95	7.67	20.53	895.30	941.56	958.44	1900
17	Regosol	Kebun . Q	24.77	5.27	14.36	1313.17	642.44	1357.56	2000
18	Regosol	Rejo Agung	49.30	8.26	6.80	660.76	574.88	725.12	1300
19	Latosol	KS. Kempit 95	32.77	2.24	7.62	1296.62	360.75	1339.25	1700
20	Latosol	KS.Kempit 86	21.86	11.57	1.23	2034.87	330.47	2069.53	2400
21	Latosol	Latasol H 24	17.91	8.25	1.68	1802.20	169.97	1830.03	2000
22	Latosol	Badean	28.77	5.13	2.97	1773.86	89.27	1810.73	1900
23	Latosol	Kbn. Jeruk	34.96	2.08	15.86	1253.19	1093.91	1306.09	2400
24	Latosol	Afd. Nongko Jajar	28.54	1.93	14.36	1471.91	383.26	1516.74	1900
25	Latosol	Afd. Besar	27.07	3.76	13.08	1049.65	1006.44	1093.56	2100
26	Latosol	Timur – Timur	28.10	0.96	11.31	1516.02	443.61	1556.39	2000
27	Latosol	Afd. Banjarsari	21.03	1.88	4.50	1457.12	215.47	1484.53	1700
28	Latosol	Afd. Antokan	44.40	19.36	34.36	702.54	799.34	800.66	1600
29	Latosol	Sbr. Manggu	24.53	1.02	19.83	1151.87	302.75	1197.25	1500
30	Latosol	Afd. Porolinggo	23.20	0.87	7.83	1683.24	184.86	1715.14	1900
31	Latosol	Afd. Polehan	26.29	5.02	10.83	1137.38	520.49	1179.51	1700
32	Glei Humik Rendah	RK. 144	26.69	3.02	19.85	1506.18	744.26	1555.74	2300
33	Glei Humik	Blater	23.00	1.17	9.17	1442.42	24.26	1475.74	1500
34	Glei Humik	Guci Putih	29.73	2.86	28.01	807.57	31.83	868.17	900
Total			930.10	198.84	354.25	50978.10	15738.72	52461.28	68200

Keterangan:

N-Amonium = (ppm N tanah NH<sub>4</sub><sup>+</sup> / N Total Terhidrolisis) \* 100%

N-Gula Amin = (ppm N tanah Gula Amin / N Total Terhidrolisis) \* 100%

N-Asam Amino = (ppm N tanah Asam Amino / N Total Terhidrolisis) \* 100%

N-Tidak Diketahui = N-Total Terhidrolisis – N (Amonium+Gula Amin+Asam Amino)

N-Tidak Terhidrolisis = N Total – N Total Terhidrolisis

Dari hasil analisis laboratorium menunjukkan bahwa tanah di perkebunan kakao memiliki kandungan nitrogen organik yang cukup tinggi yang terdapat pada fraksi N-total terhidrolisis (52.461 ppm), fraksi N-tidak diketahui (50.978 ppm), fraksi N-tidak terhidrolisis (15.738 ppm), fraksi N-amonium yang terhidrolisis (930 ppm), fraksi N-asam

amino (354 ppm), dan yang terkecil adalah fraksi N-gula amin (198 ppm).

Dari tabel 2 tersebut dapat diketahui bahwa kandungan nitrogen organik terhidrolisis jauh lebih besar jumlahnya daripada kandungan nitrogen yang tidak terhidrolisis. Bentuk N-tidak terhidrolisis (non hydrolyzable-N) merupakan bentuk nitrogen tanah yang tidak dapat dipisahkan melalui

hidrolisis asam karena bentuk nitrogen organik tersebut masih sangat lekat pada ikatan fraksi tanah. Dari tabel 2 tampak bahwa bentuk nitrogen organik terhidrolisis tanah pada areal perkebunan kakao dapat dipisahkan melalui hidrolisis asam kuat, sehingga dapat diidentifikasi bentuk nitrogen organiknya.

Namun kandungan nitrogen organik terhidrolisis yang dapat diketahui (N-asam amino, N-gula amin, N-amonium terhidrolisis) relatif lebih kecil jumlahnya daripada bentuk N-tidak diketahui. Hal ini menunjukkan bahwa nitrogen organik yang dapat dihidrolisis pada areal perkebunan kakao masih bersifat kompleks. N-tidak diketahui merupakan bentuk senyawa asam amino kompleks, sehingga belum dapat diketahui bentuk sederhana dari nitrogen organiknya.

#### V. Kesimpulan

1. Pada tanah di perkebunan kakao, kandungan nitrogen organik terbesar terdapat pada fraksi N-total terhidrolisis (52.461 ppm), fraksi N-tidak diketahui (50.978 ppm), fraksi N-tidak terhidrolisis (15.738 ppm), fraksi N-amonium yang terhidrolisis (930 ppm), fraksi N-asam amino (354 ppm), dan yang terkecil fraksi N-gula amin (198 ppm).
2. Bentuk nitrogen organik pada tanah di areal perkebunan kakao sebagian besar dapat dihidrolisis dari bentuk nitrogen total tanah (N- total terhidrolisis > N-tidak terhidrolisis).
3. Bentuk nitrogen terhidrolisis di perkebunan kakao umumnya bersifat kompleks, karena sederhana kandungan nitrogen organiknya relatif kecil (N-tidak diketahui > N-asam amino + N-gula amin + N-amonium terhidrolisis)

#### Daftar Pustaka

Bremner, J.M. 1950. The Amino-acid composition of the protein material in soil. *Journal of Agricultural Science*. 538- 542.

Cochran, T.W., Vercellotti, J.R. 1978. Hexosamine biosynthesis and

accumulation by fungi in liquid and solid media. *Carbohydr Res* 61:529-543.

Greenfield, L.G. 2001. The origin and nature of organic nitrogen in soil as assessed by acidic and alkaline hydrolysis. *European Journal of Soil Science*. 42: 575-583.

Khan, S.A., R.L. Mulvaney, and P.D. Brooks. 1998. Diffusion methods for automated nitrogen-15 analysis using acidified disks. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62:406-412.

Khan, S.A, Jing-Shu Wang and Jeffrey O. Dawson. 2001. Nitrogen Fixing Trees Influence Concentrations of Ammonium and Amino Sugar-Nitrogen in Soil. Department of Natural Resources and Environmental Sciences, University of Illinois, Urbana. USA.

Ma'shum, M., Soedarsono, J., Susilowati, L.E. 2003. Biologi Tanah. CPIU Pasca IAEUP. Bagpro Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia Ditjen Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.

Mc Donald, P., R.A. Edwards., J.F.D. Greenhalgh and C.A. Morgan. 2002. *Animal Nutrition*. Prentice Hall, London. NewYork.

Stevenson F.J. 1994. *Humus Chemistry*. 2nd edn. J Wiley, New York.

Stevenson, F.J. 1996. Nitrogen-Organic Forms.p.625-641. In A.L. Page et al.(ed.). *Methods of soil analysis*. Agron. Monogr.9. Part2.2<sup>nd</sup> ed.ASA and SSSA, Madison.