



**POLA PROTEIN PADA TANAMAN TEBU
(*Saccharum officinarum* L.)
STRES KEGARAMAN**

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

**Diajukan guna memenuhi salah satu syarat untuk
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian
Universitas Jember**



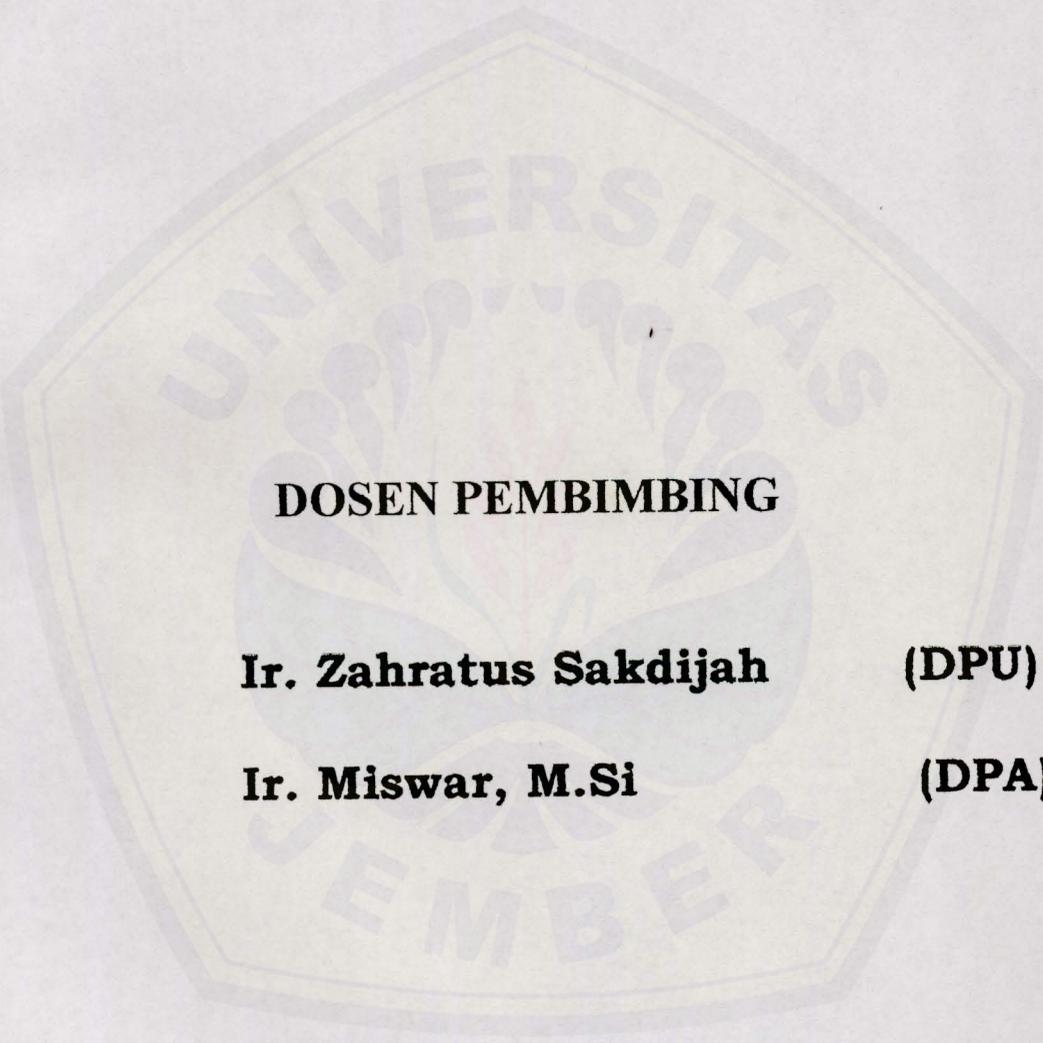
Oleh :

SUSY ARISANDY
NIM : FIB195093

Asal : Hadiah
Pembelian
Terima Tel: **29 JUN 2000**
No. Induk : PT. 2600-00-2184

Klas.
633.6
ter
p. exp
e-1
h

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2000**



DOSEN PEMBIMBING

Ir. Zahratus Sakdijah (DPU)

Ir. Miswar, M.Si (DPA)

MOTTO

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.
Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan),
kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.
Dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.
(Terjemah QS. Alam Nasyrah, 6-8)

Kegagalan tidak harus diakhiri dengan keputusasaan,
bangkit dan tekunilah kembali usahamu,
hingga suatu saat ia akan membuahkan hasil
(Susy, November '99)

Karya Ilmiah Tertulis ini kupersembahkan untuk

*Ayahanda Asmawiyanto (Alm) dan Ibunda Sutjiati
atas kasih sayang, cinta, perhatian, doa dan cucuran keringat
yang senantiasa dicurahkan untuk ananda*

*Semua Guru (TK, SD, SMP, dan SMA) dan Dosenku
yang telah membuka cakrawala pengetahuanku*

Almamaterku tercinta

LEMBAR PENGESAHAN

Diterima Oleh :

Fakultas Pertanian Universitas Jember

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan Pada :

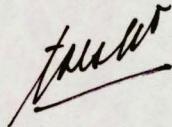
Hari : Jum'at

Tanggal : 16 Juni 2000

Tempat : Fakultas Pertanian
Universitas Jember

Tim Penguji

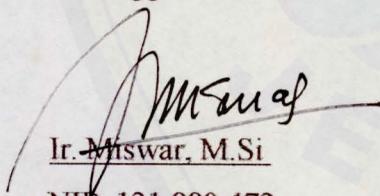
Ketua



Ir. Zahratus Sakdijah

NIP. 130 890 068

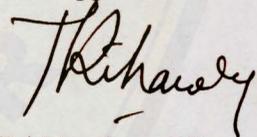
Anggota I



Ir. Miswar, M.Si

NIP. 131 880 473

Anggota II



Tri Handoyo, SP

NIP. 132 206 020

Mengesahkan

Dekan



Ir. Hj. Siti Hartanti, MS

NIP. 130 350 763

KATA PENGANTAR

Bismillahirrohmanirrohiim

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah yang maha pengasih lagi maha Penyayang atas kehendak dan rahmat-Nya maka Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi) yang berjudul "Pola Protein pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Stres Kegaraman" ini dapat diselesaikan.

Karya ilmiah Tertulis ini disusun dalam rangka memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan program sarjana pada jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penulis menyampaikan terimakasih kepada semua pihak yang telah ikut membantu tersusunnya karya tulis ini, terutama kepada :

1. Ibu Ir.Hj.Siti Hartanti, MS, selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Bapak Dr.Ir. M.Setyo Poerwoko, MS., selaku Ketua Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember.
3. Ibu Ir. Zahratus Sakdijah selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU), Bapak Ir. Miswar, M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota 1 (DPA I), dan Bapak Tri Handoyo, SP selaku Dosen Pembimbing Anggota II (DPA II), yang telah membimbing, mengarahkan dan meluangkan banyak waktu untuk penulis selama penelitian hingga terselesaikannya karya tulis ini.
4. Bapak Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc, selaku Ketua Puslit Biologi Molekuler Universitas Jember yang telah memberikan ijin tempat penelitian.
5. Seluruh staf perpustakaan Laboratorium Biologi Dasar Universitas Jember, yang telah banyak membantu.
6. Ayah dan Ibu penulis yang telah memberikan dukungan baik material maupun spiritual.

7. Teman-teman seperjuangan yang tergabung dalam *Journal Club* (Made, Ana, Zuana, Andri, Mbak Tutik, Titin, Junaedi, Mas Husni, Mas Yanto, Mas Ahyat, Mas Sigit, Mas Sandy dan Mbak Netty) yang telah banyak memberikan bantuan fisik serta masukan ide selama penelitian.
8. Sahabat-sahabatku "Hamidah, Ari, Ita, Anis dan Hikmah", serta rekan-rekan Agronomi '95 yang telah memberikan dukungan dan semangat hingga terselesaikannya skripsi ini.
9. Teman-teman Istana 77C (Anrini, Kokom, Mumun, Dewi, Dyah, Yuni, Herlin, Neni, dan Tatik) yang telah memberikan dukungan bagi penulis.

Penulis menyadari akan keterbatasan dan kekurangan dalam penulisan karya ini, untuk itu saran dan perbaikan yang membangun penulis harapkan demi kesempurnaan tulisan ini.

Akhirnya penulis berharap semoga karya tulis ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan penulis mohon maaf apabila terdapat kesalahan dalam penulisan ini.

Jember, Juni 2000

Penulis

DAFTAR ISI

Judul	Halaman
DOSEN PEMBIMBING	i
MOTTO	ii
PERSEMBAHAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
RINGKASAN	x
SUMMARY	xi
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	2
1.2.1 Tujuan.....	2
1.2.2 Manfaat.....	3
1.3 Hipotesis.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kegaraman Media dan Fisiologi Tanaman.....	4
2.2 Regulasi Biosintesis Prolin pada Tanaman Tebu Stres Kegaraman....	4
2.3 Regulasi Biosintesis Protein pada Tanaman Tebu Stres Kegaraman..	6
III. METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu.....	8
3.2 Bahan dan Alat.....	8
3.3 Metode Pelaksanaan.....	8
3.3.1 Penanaman.....	8
3.3.2 Ekstraksi Protein.....	8
3.3.3 Penentuan Total Protein Terlarut dan Elektroforesis Protein... 9	

3.3.4 Analisis Kandungan Prolin.....	9
3.3.5 Analisis Kandungan Klorofil.....	10
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian.....	11
4.1.1 Kandungan Prolin.....	11
4.1.2 Pola Protein.....	12
4.1.3 Kandungan Klorofil.....	14
4.2 Pembahasan.....	15
V. KESIMPULAN	
5.1 Kesimpulan.....	20
5.2 Saran.....	20
DAFTAR PUSTAKA.....	21

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Biosintesis Prolin dari Glutamat dan Ornitin.....	6
Gambar 2. Kandungan Prolin pada Tanaman Tebu Varietas M442-51 Stres Kegaraman.....	11
Gambar 3. Pola Protein pada Tanaman Tebu Varietas M442-51 Stres Kegaraman Berdasarkan Perbedaan Berat Molekul.....	12
Gambar 4. Pola Protein pada Tanaman Tebu Varietas M442-51 Stres Kegaraman Berdasarkan pH Titik Isoelektrik.....	13
Gambar 5. Kandungan Klorofil pada Tanaman Tebu Varietas M442-51 Stres Kegaraman.....	14

RINGKASAN

Susy Arisandy, NIM. F1B195093, Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian Universitas Jember, "POLA PROTEIN PADA TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.) STRES KEGARAMAN", dibawah bimbingan Ir. Zahratu Sakdijah (DPU) dan Ir. Miswar, M.Si (DPA).

Ekstensifikasi pertanian untuk meningkatkan produksi gula dalam negeri mulai diarahkan pada lahan-lahan marginal (termasuk di dalamnya lahan berkadar garam tinggi). Kondisi Stres menyebabkan tanaman mengadakan perubahan-perubahan morfologi, fisiologis dan metabolik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pola protein, kandungan asam amino prolin, dan klorofil pada daun tebu var. M442-51 stres kegaraman. Perlakuan kegaraman diberikan pada beberapa tingkat konsentrasi NaCl : 0%, 0.5%, 0.75%, 1%, dan 1.25%. Parameter yang diamati adalah pola protein dengan metode SDS PAGE dan IEF, kandungan asam amino prolin, dan klorofil daun tebu.

Terjadi penurunan kandungan protein dengan berat molekul 106.825 KD dan 43.25 KD seiring dengan meningkatnya konsentrasi perlakuan NaCl, dan pita kedua protein tersebut tidak tampak pada perlakuan NaCl 1.25%. Protein dengan berat molekul 24.033 KD dan 15.583 KD semakin meningkat pada konsentrasi perlakuan NaCl yang semakin tinggi. Perubahan pola protein terjadi karena perubahan proses translasi mRNA protein-protein tersebut oleh peningkatan NaCl dalam sitoplasma. Akumulasi asam amino prolin berada pada range yang sama pada perlakuan NaCl 0%-1% dan meningkat drastis pada perlakuan NaCl 1.25%. Tingginya akumulasi prolin berhubungan erat dengan peran prolin sebagai osmoprotektan pada tanaman stres. Kadar klorofil makin menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi perlakuan garam, karena terjadinya penurunan biosintesis klorofil dan/atau degradasi klorofil.

SUMMARY

Susy Arisandy, NIM. F1B195093, Agronomy Department, Agricultural Faculty , University of Jember, " PROTEIN PATTERN OF SALINITY STRESS SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.)", supervised by Ir. Zahratus Sakdijah (DPU) and Ir. Mswar,M.Si (DPA).

Agricultural extensification to increase sugar production, the present is focused to marginal lands (including salinity lands). Stress conditions turned up plant morphology, physiology and metabolic adjustments.

This research was aimed to map protein pattern, proline and chlorophyll content in sugarcane (var.M442-51) subject to salinity stress. The level of salinity treatments are : 0%, 0.5%, 0.75%, 1% and 1.25% NaCl. Parameters had observed are : protein pattern (SDS PAGE and IEF method), amino acid proline and chlorophyll contents.

The decreasing of proteins content which have 106.825 KD and 43.25 KD molecule weight concomitant with the increasing of NaCl level, moreover, those proteins bands disappear on 1.25% NaCl level. In contrast, proteins with molecule weight 24.033 KD and 15.583 KD increased in sugarcane leaves which stressed in higher NaCl level. The changes of protein pattern was caused by variations in mRNA translation process of these proteins, on different cytoplasm NaCl contents. Amino acid proline accumulations of 0%-1% NaCl treatment was in the same range, and increased drastic on 1.25% NaCl level. The enhancement of proline accumulation is related with proline role as a potent osmoprotectant in a stress plant. Chlorophyll content to be on the decrease, concomitant with the increasing of NaCl concentrations. It was caused by inhibition in chlorophyll biosynthesis and/or degradations of chlorophyll.



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tingginya permintaan gula merupakan masalah yang sedang dihadapi Indonesia, hal ini disebabkan peningkatan kebutuhan yang tidak diiringi oleh kenaikan produksi gula dalam negeri. Impor gula merupakan langkah jangka pendek yang dapat diambil, namun cara paling tepat yang harus dilakukan adalah memantapkan produksi gula dalam negeri (Anonim, 1992).

Ekstensifikasi pertanian merupakan salah satu cara yang dapat ditempuh dalam upaya meningkatkan produksi gula tebu. Dimana ekstensifikasi pertanian mulai diarahkan pada lahan-lahan marginal, mengingat semakin sempitnya lahan pertanian yang subur. Tanah-tanah berkadar garam tinggi merupakan salah satu sasaran dari perluasan areal pertanian. Masalah utama pada tanaman yang tumbuh pada tanah bergaram adalah potensial osmotik eksternal yang jauh lebih rendah daripada tanah yang tak bergaram dan peningkatan konsentrasi ion pada simplasma (sitosol) yang akhirnya akan meracuni (Greenway dan Munns, 1980; Gouia *et al.*, 1994).

Kondisi lingkungan yang tidak cocok, seperti kekeringan dan tanah bergaram tinggi dapat mengurangi berbagai aktivitas penting dalam respirasi (Cridle *et al.*, 1989) dan fotosintesis (Yeo dan Flowers, 1982; Garcia *et al.*, 1997). Stres osmotik dapat menyebabkan penurunan pertumbuhan tajuk dan memperkecil perluasan sistem perakaran (Riccardi *et al.*, 1998), membatasi pertumbuhan tanaman dan produktivitas pertanian (Boyer, 1982; Liu dan Zhu, 1997).

Tanaman merespon stres kekeringan melalui perubahan morfologi, fisiologi dan metabolik yang terjadi pada seluruh tanaman (Cellier *et al.*, 1998). Respon fisiologi tanaman untuk bertahan dalam lingkungan stres, karena beberapa protein dibentuk selama sintesis substansi stres, yang diyakini bertindak sebagai osmoprotektan (Delauney dan Verma, 1990; Bartels *et al.*, 1991; Vernon dan Bonhert, 1992; Garcia *et al.*, 1997). Tanaman yang diperlakukan dalam kondisi stres garam menginduksi gen-gen dengan tipe yang berbeda (Garcia *et al.*, 1997). Dikatakan pula oleh Kersie dan Leshem (1994) bahwa beberapa enzim dipengaruhi oleh stres kegharaman, sehingga enzim-enzim akan memberikan peranannya dalam mekanisme

penanggulangan terhadap stres kegaraman tersebut. Selain itu beberapa respon ditunjukkan seperti penutupan stomata dan biosintesis osmolite (seperti betain dan prolin). Respon tersebut sebagian dikontrol oleh ABA, fitohormon yang meningkatkan konsentrasinya pada tanaman yang kekurangan air (Zeevart dan Crellman, 1988; Riccardi *et al.*, 1998). Bentuk respon terhadap stres kekeringan dan kegaraman, beberapa spesies tanaman mengakumulasi prolin pada tingkat yang tinggi yang dimaksudkan sebagai adaptasi terhadap stres (Adams dan Frank, 1980; Greenway dan Munns, 1980; Hanson dan Hitz, 1982; Rhodes, 1987; Delauney dan Verma, 1993; Liu dan Zhu, 1997). Prolin adalah salah satu osmoprotektan penting yang diakumulasi beberapa mikroorganisme dan tanaman tingkat tinggi. Penelitian yang dilakukan terhadap suatu mutan *Nicotiana plumbaginifolia* menunjukkan bahwa terjadinya peningkatan produksi prolin menyebabkan peningkatan toleransi terhadap stres garam (Sumaryati *et al.*, 1992; Roosens *et al.*, 1999). Demikian pula penelitian terhadap tembakau transgenik oleh Kavi Kishor *et al.* (1995) dalam Roosens *et al.* (1999) membuktikan bahwa peningkatan produksi prolin pada tanaman tembakau transgenik berhubungan dengan perbaikan kemampuan dalam mentoleransi stres osmotik.

Pengetahuan yang lebih baik tentang mekanisme fisiologi dan mekanisme molekuler dengan apa dan bagaimana salinitas dan kekurangan air menghambat pertumbuhan tanaman, dapat membantu seleksi rekayasa genetik dari varietas yang lebih toleran dimasa yang akan datang (Newman, 1993; Kersie dan Leshem, 1994).

1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.2.1 Tujuan

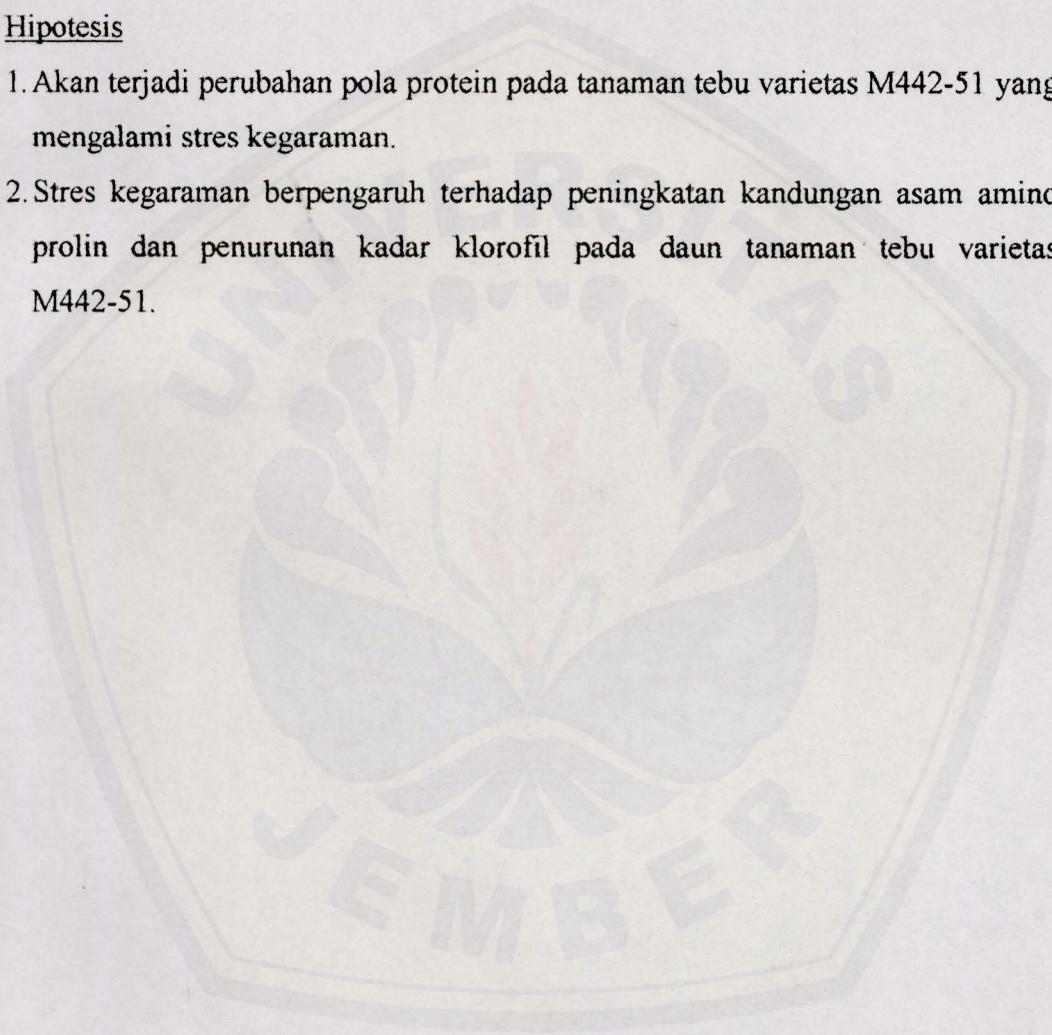
1. Mengetahui pola protein pada tanaman tebu stres kegaraman dengan metode Elektroforesis berdasarkan perbedaan berat molekul metode Sodium Dodesil Sulfat Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS PAGE) dan berdasarkan perbedaan gradien pH metode IEF (*Isoelectric focusing*).
2. Mendapatkan informasi tentang pengaruh stres kegaraman terhadap kandungan protein, asam amino prolin dan klorofil daun tanaman tebu.

1.2.2 Manfaat

Dari penelitian ini diharapkan akan diperoleh informasi baru yang akan membuka jalan menuju penelitian ke arah peningkatan produksi tanaman tebu di lahan-lahan kering atau berkadar garam tinggi.

1.3 Hipotesis

1. Akan terjadi perubahan pola protein pada tanaman tebu varietas M442-51 yang mengalami stres kegaraman.
2. Stres kegaraman berpengaruh terhadap peningkatan kandungan asam amino prolin dan penurunan kadar klorofil pada daun tanaman tebu varietas M442-51.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kegaraman Media dan Fisiologi Tanaman

Ada dua tipe utama habitat bergaram, yakni basah dan kering (Kersie dan Leshem, 1994) seperti di gurun atau di lahan yang jenuh air payau di pantai atau di dekat pesisir (Salisbury dan Ross, 1995). Kadar garam yang tinggi pada media dapat menekan pertumbuhan tanaman yang disebabkan pengaruh osmotik (stres air), pengaruh ion spesifik (ketidak seimbangan ion) atau pengaruh peracunan akibat kelebihan akumulasi ion (Lessani dan Maschner, 1978).

Dampak salinitas terhadap pertumbuhan tanaman menyebabkan berkurangnya absorpsi H_2O oleh akar karena terjadi peningkatan potensial osmotik sel akar melebihi potensial osmotik air tanah. Hal lain yang mungkin terjadi adalah penghambatan perluasan dinding sel yang bersifat tidak dapat balik, reduksi fotosintesis, hangusnya daun, terbakarnya ujung daun, dan timbulnya bercak-bercak nekrose. Berkurangnya tingkat pembelahan sel, perluasan sel pertambahan ukuran daun, bahkan kerdilnya seluruh tubuh tanaman (Kersie dan Leshem, 1994), daun menjadi hijau pucat atau kuning (Burn, 1984) juga merupakan dampak dari stres garam.

Efek kerusakan atau gangguan akibat stres garam terjadi karena dua hal. Pertama terjadinya dehidrasi yang dapat menyebabkan denaturasi beberapa protein atau membran dan yang kedua adalah pemindahan ion. Pada kondisi stres garam terjadi gangguan transport ion dimana senyawa kimia yang diakumulasi berperan sebagai kofaktor inorganik yang diperlukan beberapa enzim untuk bekerja dengan efisien. Tidak seperti sebagian besar racun herbisida, dampak NaCl atau kekurangan air, sasarannya bukanlah berupa sel tunggal (Garcia *et al.*, 1997).

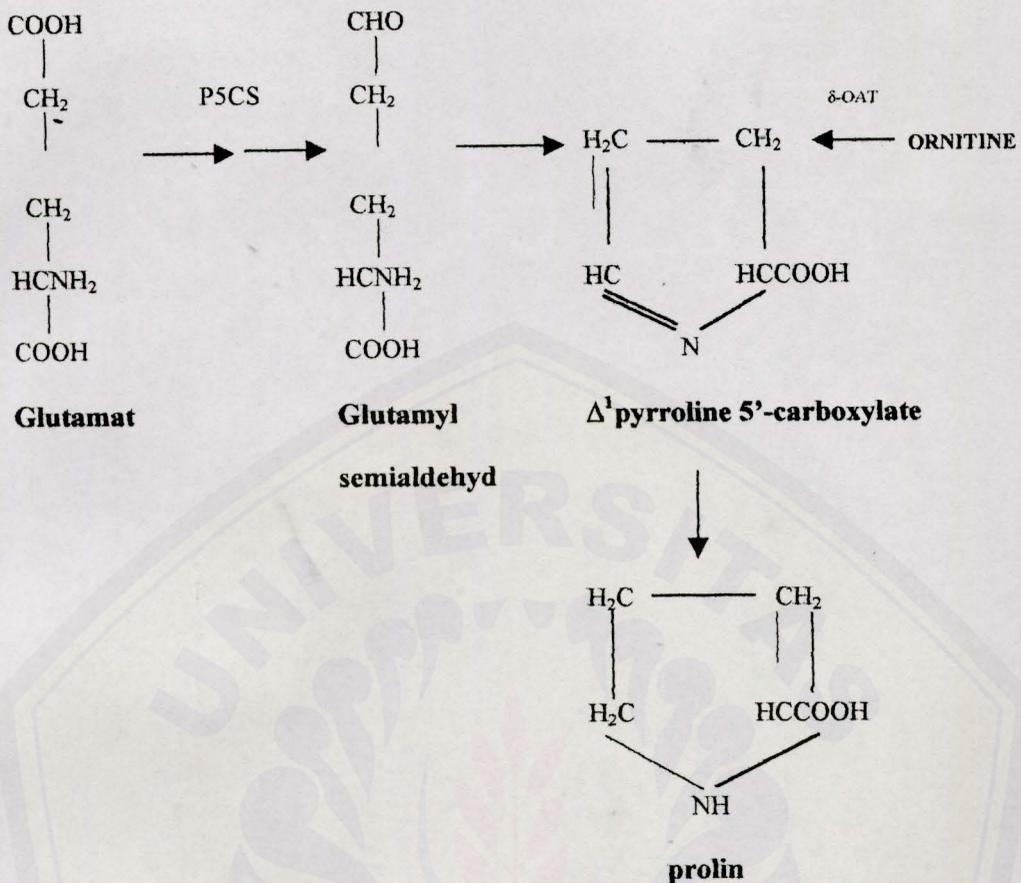
2.2 Regulasi Biosintesis Prolin pada Tanaman Tebu Stres Kegaraman

Unsur pokok yang menginduksi osmoregulasi pada tanaman tingkat tinggi salah satunya adalah senyawa organik terlarut. Bentuk senyawa organik untuk mengatasi stres termasuk asam amino, seperti prolin, glicine, betain dan senyawa organik terlarut yang lain (Kersie dan Leshem, 1994). Pada daerah pertumbuhan akar

primer jagung yang ditumbuhkan pada media berpotensi air rendah terjadi peningkatan prolin yang besar. Akumulasi prolin merupakan pengembangan respon terhadap stres lingkungan, termasuk potensial air yang rendah (Yancey *et al.*, 1982). Tingginya konsentrasi prolin pada tanaman yang stres garam atau stres air, dapat dipastikan bahwa prolin mempunyai peran yang penting yaitu sebagai suatu osmoprotektan (Verlues dan Sharp, 1999).

Diduga bahwa prolin melindungi jaringan tanaman melawan stres osmotik karena prolin adalah osmolut, sumber nitrogen yang merupakan suatu pelindung struktur enzim dan struktur sel (Stewart dan Lee, 1974; Le-Rudulier *et al.*, 1984; McCue dan Hanson, 1990; Serrano dan Gaxiola, 1994; Liu dan Zhu, 1997) dan pelenyap radikal hidroksil (Smirnonf dan Cumbes, 1989). Akumulasi osmoprotektan membantu mempertahankan keseimbangan kekuatan osmotik atau turgor sel antara sitoplasma dan lingkungan di sekitarnya untuk mencegah dehidrasi (Yancey, *et al.*, 1982; Le-Rudulier *et al.*, 1984; Cairney *et al.*, 1985; Imhoff, 1986; Yuwono *et al.*, 1999).

Pada tanaman tingkat tinggi jalur glutamat maupun ornitin digunakan untuk biosintesis prolin (Adams dan Frank, 1980). Di bawah stres osmotik, akumulasi prolin sebagian besar disintesis dari glutamat (Delauney dan Verma, 1993). Dua langkah pertama dimulai dari glutamat dikatalisa oleh enzim Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) (Adams dan Frank, 1980). Ekspresi dari P5CS diketemukan diinduksi oleh stres kegeraman, dehidrasi dan ABA (HU *et al.*, 1992; Yoshiba *et al.*, 1995). Gen P5CS, dikatakan sebagai angka pembatas dalam langkah biosintesis prolin, yang diinduksi oleh stres kegeraman (Liu dan Zhu, 1997). Enzim Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reduktase (P5CR) mengkatalisa langkah terakhir stimulasi biosintesis prolin. Pada kondisi stres garam dan stres air terjadi peningkatan jumlah mRNA P5CS dan P5CR (Hue *et al.*, 1992; Verbruggen *et al.*, 1993; Savore *et al.*, 1995; Yoshiba *et al.*, 1995; Roosens *et al.*, 1999).



Gambar 1. Biosintesis Prolin dari Glutamat dan Ornitin

2.3 Regulasi Biosintesi Protein pada Tanaman Tebu Stres Kegaraman

Tanaman dihadapkan pada berbagai macam stres disepanjang siklus hidupnya. Salah satu pendekatan untuk mengetahui kemampuan tanaman untuk tahan menghadapi stres adalah dengan mengidentifikasi terjadinya perubahan konsentrasi protein secara individu yang diinduksi oleh stres, dengan asumsi bahwa adaptasi terhadap stres merupakan hasil perubahan ekspresi gen.

Pada beberapa stres lingkungan, seperti stres air, cekaman osmotik dan stres garam menyebabkan terjadinya peningkatan sintesis pada beberapa protein dan penurunan pada sintesis protein yang lain dimana keduanya tidak selalu beriringan. Ericson dan Alfinito(1984) mengatakan bahwa 2 pita protein (30 dan 32 kD) menjadi lebih lebar (lebih tinggi kandungannya) dan satu pita protein (26 kD) yang hanya disintesis pada kondisi stres, pada SDS PAGE dari sel yang ditumbuhkan pada NaCl. Singh *et al.*, (1984) menemukan bahwa 8 pita protein meningkat, termasuk

polypeptida dengan berat molekul 26 kD, dan 4 pita protein mengalami penurunan pada sel yang diadaptasikan pada garam, polypeptida dengan berat molekul 26 kD tersebut meningkat pada jumlah yang terbesar dan merupakan 10% dari total protein seluler (Hurkman dan Tanaka, 1987). Kekurangan air juga menginduksi ekspresi protein yang tidak secara khusus berhubungan dengan stres, tetapi cenderung pada reaksi melawan kerusakan sel. Termasuk didalamnya adalah gen-gen yang berbeda kelas dengan *heat shock protein* tetapi mempunyai kesamaan asal (Heikilla *et al.*, 1984; Almoguera dan Jordano, 1992; Kyosue *et al.*, 1994), thiol protease (Guerro *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1994) dan osmotin (Kononowicz *et al.*, 1993), ferritin pada jagung, yakni suatu gen yang diinduksi oleh stres logam, stres kekeringan dan ABA (Fobis-Loisy *et al.*, 1995; Riccardi *et al.*, 1998).

Banyak gen yang diekspresikan saat terjadi defisit air dan atau perlakuan ABA, pada spesies yang berbeda mengkode RAB (*Responsive to ABA*) protein atau dehidrin yang menunjukkan hidrofilitas yang tinggi. Protein lain yang fungsinya berhubungan dengan kekurangan air diketahui diinduksi oleh defisit air atau stres kegaraman, seperti protein yang menunjukkan kesamaan asal/urutan dengan *transmembran channel protein* (Guerrero *et al.*, 1990; Yamaguchi dan Shinozaki *et al.*, 1992; Fray *et al.*, 1994; Ruitter *et al.*, 1997; Riccardi *et al.*, 1998).

Beberapa gen pada tanaman *Arabidopsis* yang diinduksi oleh stres kegaraman seperti gen RD29A diduga mengkode protein-protein yang berperan sebagai pelindung (Shinozaki dan Shinozaki, 1993), sedangkan yang lain, adalah gen AtMYB dan AtPLC. (Urao *et al.*, 1993; Hirayama *et al.*, 1995; Liu dan Zhu, 1997).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di rumah kawat (koi) Fakultas Pertanian Universitas Jember, dan dilanjutkan dengan analisa yang dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Puslit Biologi Molekuler Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian dimulai bulan Juni 1999 sampai dengan bulan Februari 2000.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tebu varietas M442-51, pasir steril, polybag, larutan nutrisi Hoagland Arnon, Nitrogen cair, reagen Bradford, PVP (polyvinil pirolidon), β -mercaptoethanol, NaCl, SDS, Tris-HCl, Acrylamide, Triton X-100, Ampholite, Ninhydrin, Toluene, serta beberapa bahan kimia yang lain.

Alat-alat yang digunakan antara lain : mikro pipet, mortal-stumper, sentrifus, spektrofotometer, elektroforesis, dan lain-lain.

3.3 Metode Pelaksanaan

3.3.1 Penanaman

Penelitian dimulai dengan menumbuhkan bibit tebu varietas M442-51 yang telah disemai selama dua minggu, pada media tanam berupa pasir steril. Pemeliharaan dilakukan dengan penyiraman nutrisi Hoagland Arnon setiap minggu. Sepuluh hari setelah pemindahan, perlakuan dengan NaCl dilakukan. Tingkat konsentrasi yang diberikan adalah : 0%, 0,75%, 1%, 1,25% sebanyak 300 ml/tanaman/hari. Pemanenan dilaksanakan ketika tanaman sudah menunjukkan gejala stres, yaitu kira-kira setelah perlakuan berjalan selama dua minggu.

3.3.2 Ekstraksi Protein

5 g daun tebu digerus dengan nitrogen cair dalam mortal-stumper, pasir kuarsa dapat ditambahkan agar cepat diperoleh ekstrak yang halus, kemudian ditambahkan dengan buffer ekstraksi (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M KCl, 0.05 M Na-EDTA, pH

7.4, 2% β -mercaptoethanol, 0.3% SDS, 0.7 M sucrose dan 10% PVP) dan fenol, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 RPM selama 20 menit. Lapisan bagian atas diambil dan ditambahkan 3-5 volume 100% methanol mengandung 0.1 M amonium acetat. Kemudian diinkubasi pada suhu -25°C selama satu malam. Protein diambil secara sentrifugasi, kemudian dicuci dengan methanol, dilanjutkan dengan pencucian dengan aceton mengandung 10 mM β -ME. Protein yang diperoleh dikeringanginkan lalu ditambahkan dengan buffer lisis (Scuster dan Davis, 1983; Anonim 1999).

3.3.3 Penentuan Total Protein Terlarut dan Elektroforesis Protein

Total Protein Terlarut ditentukan menggunakan metode Bradford (1976), protein yang telah terlarut dalam buffer lisis dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus dan ditambahkan dengan reagen Bradford hingga volume akhir 1 ml. Standar protein menggunakan BSA (Bovine Serum Albumin) yang ditambah reagen Bradford. Setelah terjadi perubahan warna, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Protein yang telah diketahui total proteinnya dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan gel *Sodium Dodesil Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis* (SDS-PAGE) dengan total protein yang sama yaitu 110 μg protein. Selain itu protein juga dipisahkan menggunakan gel *Iso electric Focusing* (IEF) yang berdasar pada perbedaan gradien pH. Kemudian dicat menggunakan larutan staining (40% methanol, 10% acetic acid, dan 1% CBB) selama 30-60 menit dan dicuci dengan larutan destaining (40% methanol dan 10% acetic acid) hingga pola protein terlihat jelas.

3.3.4 Analisis Kandungan Prolin

Kandungan prolin diukur menurut metode Troll dan Lindley (1955) dalam Bates (1973). 0,5 g sampel (daun) digerus dalam 10 ml sulfosalisilic acid 3% kemudian disentrifugasi untuk memisahkan pellet dan supernatan. 2ml supernatan/filtrat dicampur dengan 2 ml asam ninhydrin (1,25 gr ninhydrin dalam 30 ml asam acetat glasial, dan 20 ml 6 M phosphoric acid), 2 ml asam acetat glasial dan dipanaskan pada suhu 100°C selama satu jam, tepat satu jam diakhiri dengan

perendaman dalam es, kemudian ditambahkan 4 ml toluene dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm. Konsentrasi prolin dibandingkan dengan standart prolin yang telah dibuat.

Konsentrasi prolin percontoh berat basah :

$$(\mu \text{ proline/ml} \times \text{ml toluene}) / 115,5 \mu\text{g}/\mu\text{moleL/L} (\text{gr sampel})/5 = \mu\text{mole proline/gr berat basah.}$$

3.3.5 Analisis Kandungan Klorofil

Kandungan klorofil ditentukan menurut metode Arnon (1949). Daun tebu digerus dengan ditambahkan nitogen cair dan pasir kuarsa dalam mortar hingga benar-benar halus dan ditambahkan 80% acetone dengan volume sebanyak 3 kali berat basah sampel. Kemudian disentrifugasi, dan supernatannya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm . Kadar klorofi daun diperoleh dengan rumus :

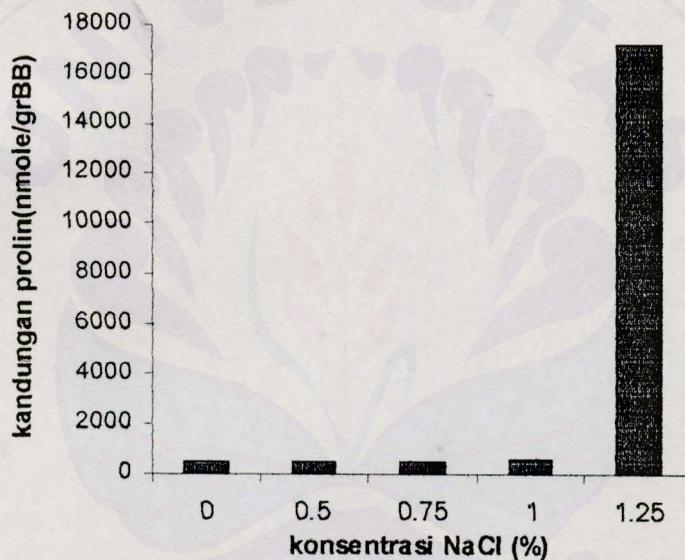
$$\mu\text{g Chl} = (20,2 \times A_{645}) + (8,02 \times A_{663})$$

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Kandungan Prolin

Kandungan prolin pada tanaman tebu stres kegaraman ini diuji menggunakan metode Troll dan Lindsley (1955). Sampel daun diambil dari lingkaran pertama batang tebu, daun sudah berkembang penuh yang biasanya ditandai dengan terbentuknya siku diantara helaian daun dan upihnya. Prolin yang sudah diisolasi dibandingkan dengan prolin murni, absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 520 nm. Data yang diperoleh disajikan pada Gambar 2.

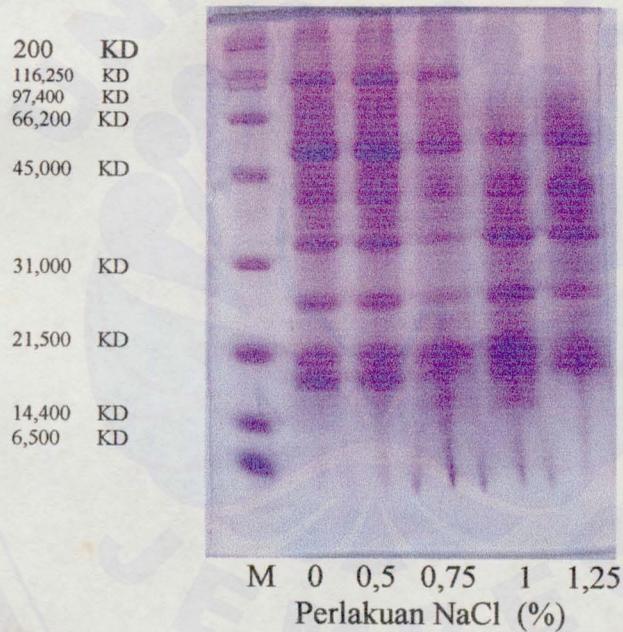


Gambar 2. Kandungan Prolin pada Tebu Varietas M442-51 Stres Kegaraman

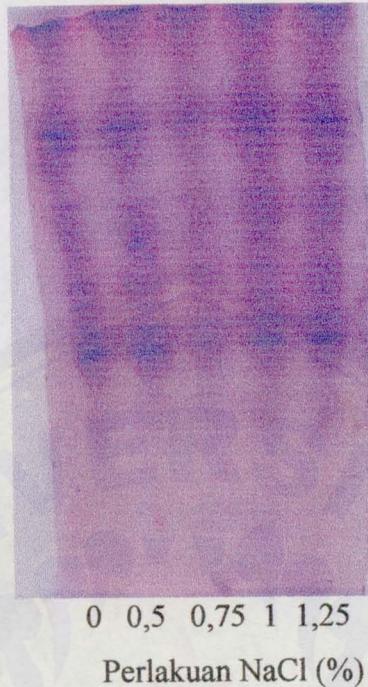
Dari Gambar 2 dapat diketahui bahwa kandungan prolin terendah dimulai dari perlakuan 0.5% NaCl, kemudian berturut-turut meningkat sedikit-demi sedikit hingga perlakuan 1% NaCl, prolin meningkat drastis pada perlakuan tertinggi (1.25%). Pada perlakuan 0% NaCl (kontrol), kandungan prolin sedikit lebih tinggi dari perlakuan 0.5-1% NaCl.

4.1.2 Pola Protein

Protein daun tebu dipisahkan menurut perbedaan berat molekulnya menggunakan metode SDS PAGE (*Sodium Dodesil Sulfat Polyacrylamide Gel Elektrofore-sis*). Protein-protein besar mengalami hambatan yang jauh lebih besar dibanding protein-protein kecil, sehingga protein saling terpisah membentuk pita-pita yang tersusun menurut berat molekulnya. Pengujian pola protein yang lain adalah pemisahan menurut perbedaan gradien pH dengan metode *Isoelektric Focussing* (IEF). Setiap protein mempunyai sebuah pH karakteristik, (titik isoelektrik), yaitu keadaan dimana protein tidak memiliki muatan netto sehingga tidak akan bermigrasi dalam suatu medan listrik (Albert *et al.*, 1994). Pola protein tanaman tebu stres kegaraman yang telah diuji menggunakan SDS PAGE dan IEF disajikan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Pola Protein Tanaman Tebu Varietas M442-51 Stres Kegaraman Berdasarkan Perbedaan Berat Molekul.



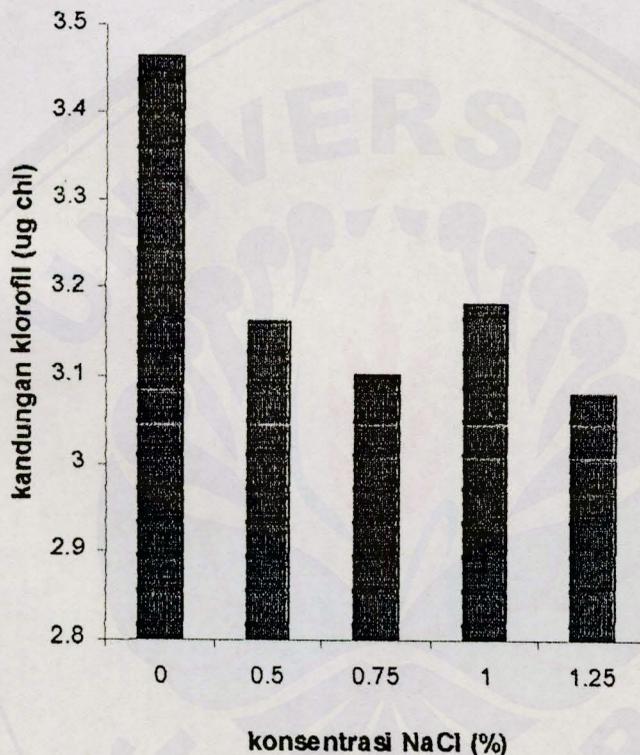
Gambar 4. Pola Protein pada Tanaman Tebu Varietas M442-51 Stres Kegaraman Berdasarkan pH Titik Isoelektrik.

Pada Gambar 3, perbedaan molekul antar perlakuan dapat terlihat bahwa semakin tinggi stres, pita protein dengan berat molekul 106,825 KD semakin menipis dan hilang sama sekali pada dua perlakuan terakhir. Demikian juga pada protein dengan berat molekul 43,25 KD, pita protein tidak terlihat pada perlakuan 1.25% NaCl. Sebaliknya ada protein yang ternyata tidak ditemui pada kadar garam rendah tetapi ditemui pada perlakuan kadar garam yang semakin tinggi (0.75 – 1.25% NaCl), yakni protein yang berat molekulnya 24,033 KD dan 15,583 KD.

Protein juga memisah membentuk pita-pita terpisah berdasarkan titik isoelektrisnya, beberapa protein mengalami perubahan pola pada perlakuan stres kegaraman yang berbeda, tetapi perbedaan pola protein pada metode IEF ini tidak sebesar pada SDS PAGE karena seharusnya kedua metode ini dipadukan untuk mengetahui dengan lebih baik protein-protein manakah yang mengalami perubahan pada beberapa tingkat stres kegaraman .

4.1.3 Kandungan Klorofil

Klorofil diperoleh dari daun pada lingkaran pertama yang sudah membentuk siku, menggunakan metode Arnon dengan acetone sebagai pelarutnya. Absorbansi klorofil yang terlarut dibaca pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm. Gambar 5 menyajikan kandungan klorofil daun tebu M442-51 yang dicekam pada beberapa tingkat konsentrasi NaCl.



Gambar 5. Kandungan Klorofil pada Tanaman Tebu Varietas M442-51 Stres Kegaraman

Kandungan klorofil pada tanaman yang mengalami stres kegaraman cenderung mengalami penurunan pada perlakuan stres yang semakin tinggi. Kadar klorofil tertinggi adalah pada perlakuan kontrol (0% NaCl) dan terendah adalah pada perlakuan kadar garam tertinggi (1.25% NaCl). Perkecualian terjadi pada kadar klorofil pada perlakuan 1% NaCl, yang mempunyai nilai lebih tinggi dari perlakuan 0.75 dan 0.5% tetapi masih lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan NaCl kontrol.

4.2 Pembahasan

Prolin pada tanaman tingkat tinggi dapat disintesa baik dari glutamat maupun ornitin, bahkan pada mikroorganisme prolin dapat pula disusun dari arginin. Enzim yang berperan pada jalur glutamat adalah Δ^1 pyrroline -5-carboxylate synthetase (P5CS) dan Δ^1 pyrroline -5-carboxylate reduktase (P5CR), sedangkan pada jalur ornitin enzim ornitin δ - aminotranferase (δ -OAT) merupakan pengkatalisa perubahan ornitin menjadi prolin. Jalur Glutamat merupakan jalur utama biosintesis prolin, dan jalur ornitin merupakan jalur alternatif. Sebagaimana disebutkan Delauney dan Verma (1993) dalam Liu dan Zhu (1997) bahwa pada kondisi stres osmotik, akumulasi prolin sebagian besar disintesis dari glutamat. Jalur ornitin hanya sedikit saja memberikan perannya terbukti dengan lambatnya peningkatan jumlah mRNA δ -OAT yang diinduksi oleh kegaraman dibandingkan mRNA P5CS (Roosens *et al.*, 1998; Roosens *et al.*, 1999). Pada kondisi stres kegaraman perubahan konsentrasi prolin dapat disebabkan oleh beberapa hal. Pertama adalah perubahan biosintesis prolin yang erat hubungannya dengan enzim yang berperan dalam biosintesisnya, yaitu P5CS dan P5CR. Kedua, hidrolisis protein, khususnya protein-protein yang mengandung prolin, dengan bantuan enzim proteolitik. Ketiga, degradasi oksidatif protein dan yang keempat adalah *feedback inhibition* (penghambatan balik) jalur biosintesis prolin. Pada kondisi non stres, ketika prolin mencapai konsentrasi tertentu aktivitas P5CS akan diturunkan, tetapi ketika tanaman mengalami stres pengaruh *feedback* menjadi hilang (Gzik, 1996).

Pada perlakuan kontrol, biosintesis asam amino prolin berjalan normal, karena kondisi fisiologis tanaman dalam keadaan normal pula, tanpa terjadinya penggunaan prolin untuk menyusun suatu protein maupun eksport prolin ke bagian lain dari tubuh tanaman, tidak juga terjadi peningkatan biosintesis prolin. Tingginya konsentrasi NaCl dalam media pertumbuhan mengakibatkan rendahnya potensial osmotik tanah dan menyebabkan defisit air, tanaman akan melakukan perubahan fisiologis dan metabolik agar tetap dapat bertahan hidup dan berproduksi. Perubahan perbandingan asam amino bebas terjadi pada tanaman stres, beberapa jenis asam amino juga meningkat selama kondisi stres garam, tetapi derajat perubahannya tidak

sebanding dengan prolin yang meningkat lebih tinggi dalam waktu yang lebih pendek (Gzik, 1996). Akumulasi prolin pada tanaman dilakukan untuk mencapai keseimbangan potensial osmotik (adaptasi osmotik) serta melindungi aktivitas dan struktur enzim (Pollard dan Jones, 1979; Crowe *et al.*, 1984; Schwab dan Gaff, 1990; Mamedof *et al.*, 1991; Colaco *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1997), juga menstabilkan protein membran ketika kegaraman media tidak seperti yang diinginkan (McNeil *et al.*, 1999). Pada perlakuan 0 – 1% NaCl terjadi sedikit peningkatan kandungan prolin pada daun. Dikatakan oleh Gzik (1996) bahwa pada kandungan air dan kondisi osmotik yang berbeda dapat saja akumulasi prolin berada pada range yang sama. Sedikitnya peningkatan akumulasi prolin pada daun tebu diduga disebabkan oleh dua hal. Pertama tingginya eksport prolin ke bagian akar, sehingga akumulasi prolin di apikal akar lebih besar (Verslues dan Sharp, 1999). Lebih lanjut dijelaskan bahwa prolin lebih banyak ditambahkan ke pool solut pada daerah perpanjangan akar yang mempunyai potensial air rendah. Dugaan ini diperkuat dengan kondisi media yang bergaram, sehingga sangat mungkin bahwa transport prolin ke daerah tersebut ditujukan untuk melawan cekaman dari sisi luar akar (Garcia *et al.*, 1997). Kedua adalah terjadinya pemanfaatan prolin untuk menyusun protein tertentu yang perlu ditingkatkan, atau untuk membentuk protein baru dengan prolin sebagai unsur pokok terbesarnya (Lea dan Good, 1995). Pada tingkatan perlakuan lebih tinggi, eksport prolin dan pemanfaatan prolin sebagai penyusun protein masih terjadi, tetapi laju biosintesis prolin pun makin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi NaCl perlakuan. Pada puncak perlakuan (1.25% NaCl) laju sintesis prolin menjadi sangat tinggi yang mengakibatkan tingginya pula kandungan prolin pada daun tebu. Biosintesis *de novo* prolin memegang peran paling dominan dalam akumulasi prolin yang tinggi pada tanaman stres, sebagai akibat dari peningkatan aktivitas enzim P5CS dan P5CR yang mengkatalisis biosintesis prolin dari glutamat yang diinduksi oleh defisit air dan stres garam (Verslues dan Sharp, 1999). Glutamat diubah menjadi glutamat semialdehid (GSA), kemudian GSA diubah menjadi Δ^1 pyrroline -5-carboxylate yang kemudian direduksi menjadi prolin (Lea dan Good, 1995). Over-produksi P5CS dan P5CR disebabkan oleh peningkatan level mRNA P5CS dan P5CR serta peningkatan aktivitas kedua enzim. Naiknya aktivitas P5CS dan P5CR

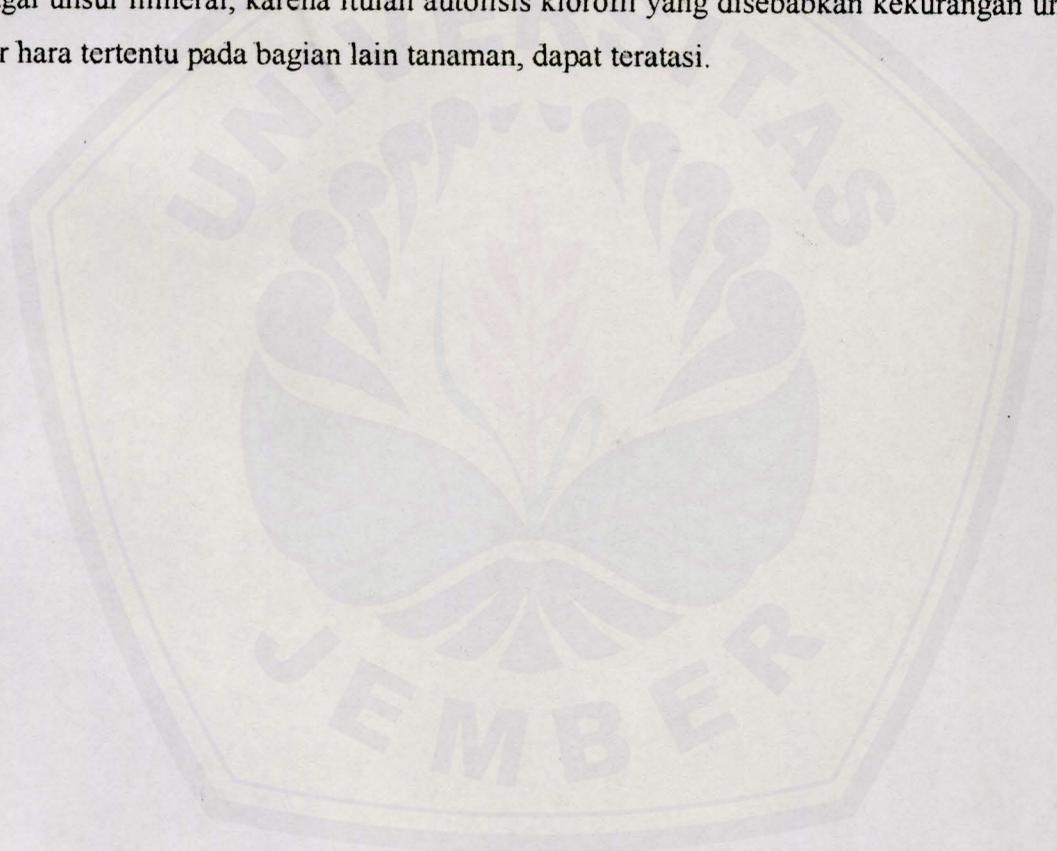
sebagai akibat dari peningkatan transkripsi gen *p5cs* dan *p5cr* (Szoke, 1992). Hidrolisis beberapa protein dan proses degradasi oksidatif protein, terutama protein-protein yang mengandung asam amino prolin, juga akan memberikan sumbangan terhadap tingginya akumulasi prolin. Hal lain yang cukup penting dalam akumulasi prolin pada tanaman stres adalah penghambatan balik (*feedback inhibition*) biosintesis prolin oleh konsentrasi prolin itu sendiri. Pada tanaman non stres, ketika prolin mencapai konsentrasi tertentu, aktivitas P5CS akan mulai dihambat, jalur biosintesis akan mulai berbalik menjadi jalur degradasi oleh enzim prolin dehidrogenase (PDH) yang mengkatalisa konversi dari prolin ke Δ^1 pyrroline -5-carboxylate (P5C), kemudian P5C dioksidasi menjadi glutamat oleh Δ^1 pyrroline -5-carboxylate dehidrogenase (P5CD). Kondisi kegaraman yang tinggi pada media menyebabkan menurunnya potensial air jaringan tanaman, sehingga tanaman mengalami stres dan saat itu terjadi penurunan ekspresi mRNA gen *pdh* (Kyosue *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996; Roosens *et al.*, 1999) serta penurunan aktivitas enzim PDH (Stewart dan Boggess, 1978; Rayapati dan Stewart, 1991; Sudhakar *et al.*, 1993; Forlani *et al.*, 1997; Roosens *et al.*, 1999).

Stres kegaraman dapat merubah pola protein pada daun tanaman tebu varietas M442-51, karena enzim juga merupakan protein maka kemungkinan beberapa enzim mengalami perubahan selama tanaman tebu tercekam kegaraman. Defisit air dan menurunnya turgor sel tanaman menyebabkan penutupan stomata yang menurunkan absorpsi CO_2 dari udara. Rendahnya konsentrasi CO_2 dalam kloroplas dapat menyebabkan penurunan aktivitas beberapa enzim seperti SPS dan NR serta terjadinya peningkatan aktivitas RUBISCO (Baker, 1996). Perubahan yang terjadi pada protein dapat berupa peningkatan atau penurunan kadar pada jenis protein yang sama, atau bahkan munculnya protein baru yang terinduksi oleh stres NaCl. Dalam kondisi stres garam gen-gen khusus yang mengkode protein yang terlibat dalam upaya mengatasi toksitas ion diekspresikan. Terjadinya perubahan biosintesis protein yang diinduksi oleh peningkatan NaCl dalam sitoplasma, karena terjadinya perubahan proses translasi mRNA (Hurkman dan Tanaka, 1987). Perubahan pola protein pada Gambar 3 dan 4 berupa pelebaran pita protein (kandungan protein meningkat) dan penyem-

pitan pita protein (kandungan protein menurun) pada kondisi stres yang semakin tinggi. Protein yang meningkat kandungannya adalah protein yang mempunyai berat tersebut molekul 24.033 KD dan 15.583 KD. Protein ini mempunyai hubungan erat dengan ketahanan terhadap stres kegaraman, baik secara langsung maupun tidak. Beberapa contoh protein yang diinduksi oleh stres antara lain, protein *Responsive to ABA* dengan berat molekul 17 KD (RAB 17) yang terdapat pada jagung yang stres air (Vilardell *et al.*, 1990; Riccardi *et al.*, 1998), *Early Light Induced Protein* (ELIP) terdapat pada daun tanaman stres air. ELIP tidak berhubungan langsung dengan stres air, tetapi cenderung pada dampak sekunder reduksi pertumbuhan, pembelahan dan perpanjangan sel (Bartels *et al.*, 1992; Ouvard *et al.*, 1996; Riccardi *et al.*, 1998). Protein *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) terdapat pada tanaman yang mengalami stres air (Dure *et al.*, 1989; Cellier *et al.*, 1998), juga protein DIP27 (*Drought Inducible Protein 27 KD pl 6.8*) meningkat kandungannya pada tanaman tebu varietas M442-51 stres air. Protein dengan berat molekul 106.825 KD dan 43.25 KD semakin menurun kandungannya seiring dengan meningkatnya konsentrasi NaCl, bahkan tidak tampak pada perlakuan 1.25% NaCl. Penurunan kadar protein pada tanaman stres terjadi akibat reduksi absorpsi nitrat dalam tanah dan penurunan aktivitas NR selama defisit air yang disertai oleh meningkatnya pembongkaran protein kloroplas yang merupakan sumber penting dari bentuk nitrogen. Perusakan ini dapat menyebabkan penurunan fotosintesis daun akibat pembatasan jumlah enzim fotosintesis pada tanaman yang menderita cekaman berkepanjangan (Baker, 1996).

Penurunan klorofil seiring dengan peningkatan kadar garam media dapat diakibatkan oleh terjadinya penurunan biosintesis klorofil dan/atau degradasi klorofil. Sintesis klorofil mengalami penurunan karena pada kondisi stres garam terjadi defisit air, sedangkan pada biosintesis klorofil diperlukan dua molekul air untuk memproduksi satu unit klorofil, yakni pada tahap perubahan 2 molekul δ aminol evulinic acid menjadi porphobilinogen oleh enzim δ aminol evulinic acid dehidrase (Abidin, 1987). Selain itu dihambatnya biosintesis klorofil dapat pula disebabkan oleh terbatasnya mineral penyusun struktur klorofil yang masuk dari dalam tanah ke akar tanaman. Bahkan karena keterbatasan mineral yang terserap menyebabkan

tanaman harus melakukan autolisis klorofil dan mentranslokasikan unsur hara yang dibutuhkan ke bagian tanaman lain yang memerlukannya. Unsur-unsur bersifat mobil yang biasanya ditraslokasikan sebagai hasil dari autolisis klorofil adalah unsur Mg dan N. Pada perlakuan 1% ternyata kadar klorofil cukup tinggi (urutan tertinggi ke dua setelah kontrol). Hal ini diduga diakibatkan oleh penghambatan biosintesis klorofil tetap terjadi akibat defisit air, tetapi kekurangan unsur hara penyusun klorofil dapat diatasi oleh adanya *beneficial effect* dari unsur Na. Kandungan 1% NaCl pada media tanam ini dapat dipahami sebagai titik dimana ion Na dapat menggantikan K. Salah satu peranan K bagi tanaman adalah mengawasi dan mengatur aktivitas berbagai unsur mineral, karena itulah autolisis klorofil yang disebabkan kekurangan unsur hara tertentu pada bagian lain tanaman, dapat teratasi.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Terjadi perubahan pola protein pada tanaman tebu varietas M442-51 stres kegaraman, baik berupa peningkatan, penurunan, sintesis protein baru atau dihambatnya sintesis protein tertentu.
2. Stres kegaraman menyebabkan perubahan kandungan protein, tingginya akumulasi asam amino prolin, dan penurunan kandungan klorofil daun tanaman tebu varietas M442-51.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan informasi yang lebih lengkap mengenai identitas protein yang mengalami perubahan selama stres kegaraman sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam rangka pemuliaan tanaman tebu melalui rekayasa genetika.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin Z., 1987, *Dasar Pengetahuan Ilmu Tanaman*, Angkasa, Bandung.
- Albert B., B. Dennish, L. Julian, R. Martin, D.W. James, *Molecular Biology of The Cell*, Terjemahan Alex Tri Kantjono W., *Biologi Molekuler Sel*, 1994, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Anonim, 1992, *Pembudidayaan Tebu di Lahan Sawah dan Tegalan*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Anonim, 1999, *Lecture and Practical Manual for Workshop on Plant Molecular Biology*, Reserch Centre for Molecular Biology University of Jember, Jember.
- Baker N.R., 1996, *Photosynthesis and The Environment*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Bates L.S., 1973, Rapid Determination of Free Proline for Water -Stress Studies, *Plant and Soil* 39 : 205-207.
- Bradford, M. M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72 : 248-254
- Burn F.B., 1984, *Sugarcane*, Logman Group Limited, N.York.
- Cellier F., G. Conejero, J.C. Breitler, F. Casse, 1998, Molecular and Physiological Responses to Water Deficit in Drought-Tolerant and Drought-sensitive Lines of Sunflower, *Plant Physiol* 116: 319-328.
- Garcia A.B., J.A. Engler, S. Iyer, T. Gerats, M.V. Montagu, A.B. Caplan, 1997, Effects of Osmoprotectans upon NaCl Stress in Rice, *Plant Physiol* 115: 159-169.
- Gouia H., M.H. Ghorbal., B. Touraine, 1994, Effects of NaCl on Flows of N and Mineral Ions and on NO₃⁻ Reduction Rate Within Whole Plants of Salt-sensitive Bean And Salt Tolerant Cotton, *Plant Physiol* 105 : 1409-1418.
- Gzik A., 1996, Accumulation of Proline and Pattern of α -Amino Acid in Sugar Beet Plants in Respons to Osmotic, Water and Salt Stress, *Environment and Experiment Botany*, 36, vol. 1 : 29-31.
- Hurkman W.J., C.K. Tanaka, 1987, The Effects of Salt on The Pattern of Protein Synthesis in Barley Roots, *Plant Physiol* 83 : 517-524.

- Kersie B.D.M., Y.Y. Leshem, 1994, *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*, Kluwer Academic Publishers, London.
- Lea P.J., R.C.L. Good, 1995, *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley and Sons, England.
- Lessani H., H. Maschner, 1978, *Relation Between Salt Tolerance and Long Distance Transport of Sodium and Chloride in Various Crop Species*, Institute of Crop Science-Plant Nutrition, Technical University of Berlin, Berlin.
- Liu J., J.K. Zhu, 1997, Proline Accumulation and Salt -Stress Induced Gene Expression in a Salt-Hypersensitive Mutant of Arabidopsis, *Plant Physiol* 114 : 591-596.
- McNeil S.D., M.L. Nuccio, A.D. Hanson, 1999, Betaines and Related Osmoprotectants Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance, *Plant Physiol* 20 : 945-949.
- Riccardi F., P.Gaeau, D. Vlenne, M. Zivy, 1998, Protein Changes in Response to Progressive Water Deficit In Maize, *Plant Physiol* 117: 1253-1263.
- Roosens N.H., R. Willem, Y. Li, I. Verbruggen, M. Biesemans, M. Jacobs., 1999, Proline Metabolism in The Wild-Type and in a Salt-Tolerant Mutant of *Nicotiana plumbaginifolia* Studied by ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Imaging, *Plant Physiol* 121 : 1281-1290.
- Salisbury F.B., C.W. Ross, 1995, *Fisiologi Tumbuhan Jilid 3*, Penerbit ITB, Bandung.
- Szoke A., G.H. Miao, Z Hong, D.P.S. Verma, 1992, Subcellular Location of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Reductase in Root/Nodule and Leaf of Soybean, *Plant Physiol* 94 : 1642-1649.
- Verslues P.E., R.E. Sharp, 1999, Proline Accumulation in Maize (*Zea mays* L.) Primary Roots at Low Water Potentials. II. Metabolic Source of Increased Proline Deposition in The Elongation Zone, *Plant Physiol* 119 : 1349-1360.
- Yuwono T.E. Mursyanti, Ngadiman, J. Soedarsono, 1999, Cloning of Betain Aldehyde Dehydrogenase Gene of *Escherichia coli* and Its Use as a Probe for Related Gene in Salt-Tolerant Rhizospheric Microorganism, *Indonesian Journal of Biotechnology*, June : 253-259.