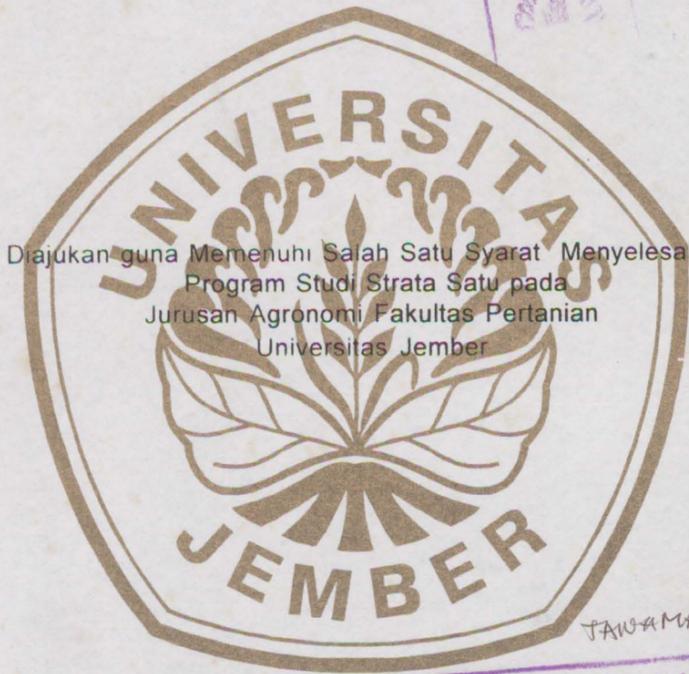


TIDAK DIPINJAMKAN KELUAR

**AKTIVITAS PHOSPOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE PADA  
POSISI DAUN TANAMAN NANAS ( *Ananas comosus* L. )  
YANG BERBEDA AKIBAT STRES NaCl**

**KARYA ILMIAH TERTULIS  
( SKRIPSI )**



Diajukan guna Memenuhi Salah Satu Syarat Menyelesaikan  
Program Studi Strata Satu pada  
Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian  
Universitas Jember

MILIK PERPUSTAKAAN  
JEMBER

TANAMAN NANAS 5

Oleh :

**HUSNI THAMRIN**

NIM : 9415101125

Asal	: Hadiah	Klass
Penyediaan		634-7
Terima Tel:	12 JUN 2000	THA
duk :	PTI 2000 10-265	Per
		e.1

JURUSAN AGRONOMI FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
MEI, 2000

**Ir. Sugeng Prasetyo Kasno, MS**  
Dosen Pembimbing Utama

**Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc.**  
Dosen Pembimbing Anggota I

**Ir. Mizwar, M.Si.**  
Dosen Pembimbing Anggota II

**Karya Tulis ini kupersembahkan kepada :**

- ❖ Ayahanda dan Ibunda yang telah memberikan do'a restu dan memberi segalanya baik material maupun spiritual dengan tulus dan ikhlas.
- ❖ Kedua kakakku Sekeluarga yang telah memberikan dorongan semangat dan materi.
- ❖ Serta semua sahabat-sahabat saya

## Motto

*Orang bijaksana akan menjadi  
Majikan dari Pikirannya dan  
Orang Bodoh akan menjadi Budaknya  
(Schwartz, D. J.)*

DITERIMA OLEH :  
FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER  
SEBAGAI  
KARYA ILMIAH TERTULIS (SKRIPSI)

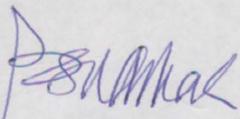
Dipertahankan pada  
Hari : Kamis  
Tanggal : 11 Mei 2000  
Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji  
Ketua



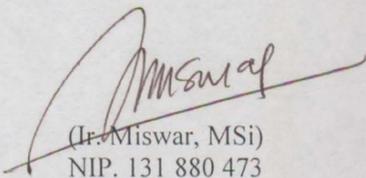
(Ir. Sugeng Prasetyo Kasno, MS)  
NIP. 130 516 234

Anggota I



(Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc.)  
NIP. 131 131 021

Anggota II



(Ir. Miswar, MSi)  
NIP. 131 880 473



Mengesahkan  
Dekan

( Ir. Hj Siti Hartanti, MS )  
NIP. 130 350 763



## KATA PENGANTAR

Syukur *Alhamdulillah*, karena rahmat dan hidayahnya-Nya sehingga penulisan Karya Ilmiah Tertulis yang berjudul "Aktivitas *Phosphoenolpyruvate carboxylase* pada Posisi Daun Tanaman Nanas (*Ananas comusus*) yang Berbeda Akibat stres NaCl" dapat terselesaikan dengan baik.

Karya Ilmiah Tertulis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Program Sarjana Strata Satu di Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Penyelesaian pelaksanaan penelitian dan penulisan karya ini telah banyak menerima bantuan dari berbagai pihak, secara langsung maupun tidak langsung. Untuk itu penulis ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. **Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MAgrSc**, Ketua Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember dan selaku Dosen Pembimbing Anggota atas segala bimbingan dan fasilitas yang telah diberikan,
2. **Ir. Sugeng Prasetyo Kasno, MS**, Dosen Pembimbing Utama atas segala bimbingan yang telah diberikan,
3. **Ir. Mizwar, MSi**, Dosen Pembimbing Anggota atas segala bimbingan yang telah diberikan,
4. **Prof Dr. Maurice S.B. Ku**, atas kerjasama dan bimbingannya.
5. Semua Dosen di Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas antara lain **Tri Handoyo, Tri Agus S., Agung W. dan lainnya** yang telah memberikan masukan dan sarannya.
6. Teman-temanku yang sangat banyak membantu selama pelaksanaan penelitian, antara lain **Sandi, Nety, Joko, Yanto, Sigit, Ahyat, Junaedi, Tutik, Ana, Andri, Zuana, Titin, Susy, Hamida, Made dan lainnya** yang tak mungkin ditulis satu persatu.

Akhirnya, penulis berharap semoga apa yang telah kami hasilkan ini dapat bermanfaat dan dapat dikembangkan lebih lanjut.

Jember Mei 2000

Husni Thamrin

## DAFTAR ISI

JUDUL .....	i
PEMBIMBING.....	ii
PERSEMBAHAN .....	iii
MOTTO .....	iv
PENGESAHAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR ISTILAH .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
RINGKASAN .....	xi
SUMMARY .....	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan.....	2
1.3 Manfaat.....	2
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Karakteristik Tanaman CAM.....	4
2.2 Pengaruh Kegaraman Terhadap Fisiologi Tanaman .....	5
2.3 Ekspresi dan Regulasi PEPC pada Tanaman CAM .....	7
<b>BAB III. BAHAN DAN METODE</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	9
3.2 Bahan dan Alat .....	9
3.3 Rancangan Penelitian .....	10
3.4 Pelaksanaan Penelitian .....	10
3.4.1 Penanaman .....	10
3.4.2 Perlakuan Cekaman Kegaraman .....	10
3.4.3 Ekstraksi dan Pengukuran Aktivitas PEPC .....	11
3.4.4 Analisa Kandungan Total Protein Terlarut.....	11
3.4.5 Analisa Keasaman Jaringan .....	11
3.4.6 Analisa Western Blot .....	12

3.4.7 Analisa Kandungan Asam Amino Prolin .....	12
3.5 Parameter Pengamatan .....	13
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian .....	14
4.2 Pembahasan .....	18
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	21
5.2 Saran .....	21
DAFTAR PUSTAKA .....	22

## DAFTAR ISTILAH

CAM	: Crassulacean Acid Metabolisme
PEPC	: Phosphoenolpyruvate Carboxylase
Rubisco LSU	: Ribulosa bisphosphate Carboxylase/ Oxydase Large Sub Unit
Rubisco SSU	: Ribulosa bisphosphate Carboxylase/ Oxydase Small Sub Unit
MDH	: Malate Dehidrogenase
NADP-ME	: Nicotinamid Adenin Dinukleotida Phosphat-Malate Enzyme
TPT	: Total Protein Terlarut
BSA	: Bovin Serum Albumin
DTT	: Dithiothrietol
EDTA	: Ethylene Diamine Tetra Acid
PVP	: Polyvynilpolypirrolidone
SDS-PAGE	: Sodiumdedocyl Sulfat-polyacrilamide Gel Electroforesis
BCIP	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil phosphate
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium

## DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1 : Rata-rata akumulasi keasaman jaringan daun terhadap rata-rata masing-masing perlakuan pada posisi daun nomor ke-3 sampai nomor ke-10 dari pucuk tanaman .....13
- Gambar 2 : Akumulasi bersih keasaman jaringan daun pada masing-masing perlakuan Kontrol ; 250 mM NaCl ; 500 mM NaCl pada posisi daun nomor ke-3 sampai nomor ke-10 dari pucuk tanaman ..... 14
- Gambar 3 : Aktivitas PEPC pada perlakuan Kontrol ; 250 mM NaCl ; 500 mM NaCl pada posisi daun nomor ke-3 sampai nomor ke-10 dari pucuk tanaman ..... 14
- Gambar 4 : Hubungan rata-rata aktivitas PEPC dengan rata-rata total bersih keasaman jaringan daun dari daun nomer ke-3 sampai daun nomer ke- 10 dari pucuk tanaman. .... 15
- Gambar 5 : Ekspresi PEPC dan Rubisco pada perlakuan Kontrol ; 250 mM NaCl ; 500 mM NaCl pada posisi daun nomer ke-8 dari pucuk daun dengan kandungan protein 80  $\mu$ L per line dengan separasi 12,5 % SDS-PAGE ..... 16
- Gambar 6 : Akumulasi asam amino prolin pada masing-masing perlakuan kontrol; 250 mM NaCl; 500 mM NaCl yang dianalisa pada daun nomer 2 sampai daun ke- 10 dari pucuk ..... 17

## RINGKASAN

Husni Thamrin (9415101125), *Aktivitas Phosphoenolpyruvate Carboxylase Pada Posisi Daun Tanaman Nanas (Ananas comosus L) yang Berbeda Akibat Stres NaCl*, dibimbing oleh Ir. Sugeng Prasetyo Kasno, MS, selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr. Ir. Bamabang Sugiharto, M.Agr.Sc, selaku Dosen Pembimbing Anggota I, dan Ir. Miswar, MSi, selaku Dosen Pembimbing Anggota II.

Tanaman nanas tergolong tanaman CAM. Tanaman CAM memiliki enzim fotosintesis kunci yaitu PEPC (Phosphoenolpyruvate Carboxylase). PEPC dan senyawa osmoprotektan (asam amino prolin) sangat ditentukan oleh kondisi lingkungan kegaraman, maka dilakukan penelitian tentang pengaruh NaCl pada PEPC dan asam amino prolin pada tanaman nanas. Hasil penelitian pada tanaman nanas dalam pot dengan media pasir yang diperlakukan stres NaCl selama 12 hari pada konsentrasi NaCl yang meningkat (Kontrol; 0,25 M NaCl dan 0,50 M NaCl), umur fisiologis daun yang meningkat, menunjukkan adanya peningkatan aktivitas PEPC yang diikuti oleh peningkatan keasaman jaringan, kandungan protein PEPC dan Rubisco mengalami penurunan sedangkan akumulasi asam amino prolin cenderung tidak berpengaruh oleh kondisi tersebut.

**Kata kunci :** CAM = Crassulacean Acid Metabolisme; Stres NaCl; PEPC = Phosphoenolpyruvate Carboxylase; Rubisco = Ribulosa biphosphate Carboxylase/Oxydase

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Pertumbuhan penduduk yang pesat akan meluasnya lahan pemukiman sehingga menyempitkan lahan pertanian yang menghambat perkembangan produksi pertanian secara umum. Semenjak itulah kita mulai melirik lahan marginal sebagai lahan alternatif pertanian. Pemanfaatan kondisi lahan marginal menghadapkan kita pada kondisi yang kurang menguntungkan bagi pertumbuhan tanaman misalnya lahan kering, lahan pasang surut dengan salinitas yang tinggi. Respon tanaman terhadap lingkungan kegaraman sangat kompleks. Menurut Stroehrer *et al* (1995), menyatakan bahwa stres garam dengan konsentrasi NaCl yang tinggi pada jaringan tanaman menyebabkan terganggunya proses metabolisme pada sistem penyerapan air serta hara mineral yang akibatnya akan merubah keseimbangan air dalam sel dan terbatasnya pertumbuhan.

Hal diatas mengingatkan kita bahwa tidak semua tanaman mampu hidup normal dalam kondisi tercekam sehingga tidak semua tanaman sanggup mempertahankan hidupnya. Tanaman yang mempunyai efisiensi penggunaan air lebih tinggi diduga mempunyai ketahanan yang lebih baik terhadap kondisi lingkungan berkadar garam tinggi (Taiz dan Zeiger, 1991).

Tanaman dalam kondisi tercekam kekeringan akan merangsang beberapa gen untuk beradaptasi terhadap cekaman tersebut. Pada keadaan cekaman lingkungan tanaman akan mengalami penambahan sintesa protein dan pengurangan sintesa protein lain dengan atau tanpa tergantung pada derajat kelemahan cekaman terhadap protein (Hurkman dan Tanaka, 1987). Salah satu mekanisme fisiologis tanaman dalam menanggapi kondisi lingkungan yang ekstrim seperti kegaraman tinggi dan kekurangan air adalah dengan meningkatkan akumulasi senyawa-senyawa *osmoregulation* seperti asam amino prolin, betaine, ataupun karbohidrat (Salisbury dan Ross, 1991).

Tanaman *Crassulacean acid metabolism* (CAM) adalah tanaman yang mampu beradaptasi terhadap kegaraman dan kekeringan dengan mekanisme penutupan stomatanya pada siang hari dan membuka pada malam hari. Pengaturan

tekanan turgor, perbedaan tekanan uap air antara daun dan udara disekitarnya yang menentukan transpirasi, akan banyak berkurang pada malam. Akibatnya, tanaman CAM mempunyai efisiensi penggunaan air yang paling tinggi di antara tanaman tingkat tinggi.

Tingkat pertumbuhan tanaman ditentukan oleh tingkat asimilasi karbon. Asimilasi karbon pada tanaman  $C_4$  ditentukan oleh PEPC (Sugiyama *et al.*, 1986; Richard *et al.*, 1987; Sugiharto *et al.*, 1992). Penelitian terdahulu menyebutkan aktivitas enzim utama untuk asimilasi karbon dipacu pada kondisi kegeraman atau kekeringan (Chusman *et al.*, 1989). Hal yang sama disebutkan bahwa tanaman *Mesembryanthemum crystallinum* yang tercekam kegeraman, aktivitas PEPC meningkat (Schmitt *et al.*, 1987). Peningkatan mRNA PEPC teramati bersamaan dengan peningkatan protein PEPC (Thomas *et al.*, 1992).

Dari uraian diatas diduga karakter enzim kunci fotosintesis pada tanaman CAM yaitu PEPC dan senyawa osmoprotektan (asam amino prolin), sangat ditentukan oleh kondisi lingkungan kegeraman. Untuk itulah dipelajari lebih lanjut karakter PEPC sebagai enzim kunci fotosintesis pada tanaman CAM akibat stres NaCl. Selain itu juga dipelajari karakter asam amino prolin pada tanaman nanas yang dikenal sebagai senyawa osmoprotektan selama kondisi kekeringan.

### 1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas Phosphoenolpyruvate Carboxylase dan akumulasi asam amino prolin pada posisi daun tanaman nanas (*Ananas comosus*) yang berbeda akibat stres NaCl yang asimilasi karbonnya melalui jalur CAM.

### 1.3 Manfaat

Hasil penelitian ini sebagai informasi dasar tentang karakter fisiologis tanaman CAM selama cekaman kegeraman, diharapkan hasil penelitian ini juga akan membantu program konservasi lahan sebagai peningkatan pengembangan dan perluasan lahan pertanian.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

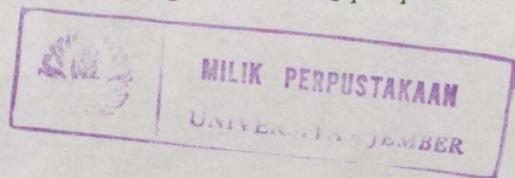
### 2.1 Karakteristik Tanaman CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*)

Secara fotosintetik tanaman dibedakan menjadi tiga kelompok utama yaitu tanaman C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> dan CAM. Perbedaan utama dari jenis tanaman tersebut terletak pada proses asimilasi karbonnya (Sugiyama dan Huber, 1986). Tanaman C<sub>3</sub> memfiksasi CO<sub>2</sub> menjadi asam beratom C<sub>3</sub> yang dikatalis oleh Rubisco, tanaman C<sub>4</sub> adalah tanaman yang memfiksasi CO<sub>2</sub> menjadi asam beratom C<sub>4</sub> dikatalis oleh PEPC proses ini terjadi pada siang hari sedangkan tanaman CAM adalah tanaman yang memfiksasi CO<sub>2</sub> menjadi asam beratom C<sub>4</sub> oleh PEPC seperti tumbuhan C<sub>4</sub>, hanya bedanya fiksasi karbon ini terjadi pada malam hari saat stomata daun terbuka dengan energi berasal dari proses glikolisis. Tanaman yang termasuk CAM kebanyakan merupakan tanaman sukulen, yang memiliki daun atau batang berdaging. Beberapa tanaman CAM yang termasuk tanaman budidaya adalah nanas, agave, dan buah pir berduri (Gardner *et al.*, 1985).

Suatu tanaman dikategorikan sebagai tanaman CAM apabila memenuhi kriteria sebagai berikut : (a) mengalami fluktuasi harian keasaman; (b) fluktuasi harian karbohidrat cadangan yang bersifat timbal balik; (c) aktifitas PEPC tinggi dan dekarboksilase aktif; (d) vakuola yang besar dan terdapat kloroplas pada sel yang sama ; (e) kandungan air batang dengan klorenkim yang rapat; (f) terjadinya pertukaran gas pada malam hari (Ting, 1985).

Tanaman CAM dikenal dengan kemampuan hidupnya, terutama di bawah kondisi cekaman air dengan asimilasi CO<sub>2</sub> di malam hari. Hasil asimilasi karbon tersebut diakumulasikan sebagai asam malat dalam vakuola dan menyebabkan peningkatan keasaman. Pada siang hari kadar asam organik total daun menurun dan pH sel daun meningkat, sedangkan pada malam berikutnya kadar asam organik kembali meningkat dan pH sel daun menurun (Noggle dan Fritz, 1979).

Tanaman CAM dan C<sub>4</sub> menggunakan mekanisme *CO<sub>2</sub> pump* untuk meningkatkan konsentrasi CO<sub>2</sub>. Hal ini dapat menekan terjadinya proses fotorespirasi dan kemampuan kompetitif tanaman tersebut dalam kondisi intensitas cahaya tinggi, temperatur tinggi atau ketersediaan air yang rendah. *CO<sub>2</sub> pump* ini



karena keberadaan PEPC yang merupakan enzim utama karboksilasi. Pada tanaman  $C_4$ , pemusatan  $CO_2$  ini dicapai dengan koordinasi antara dua reaksi karboksilasi yang terpisah, yaitu dalam mesofil dan dalam sel seludang ikatan pembuluh (Furbank dan Taylor, 1995; Ku *et al.*, 1996). Sebaliknya, pada tanaman CAM kedua reaksi karboksilasi tersebut terjadi dalam satu sel, tetapi kedua reaksi tersebut berlangsung pada waktu yang berbeda (Chusman dan Bohnert, 1997).

Tanaman yang termasuk dalam golongan CAM dibagi dalam tiga tipe dengan perbedaan tanggapan fisiologis terhadap cekaman lingkungan. Tipe pertama adalah *CAM-cycling* yang tanggap terhadap cekaman lingkungan dengan melakukan penutupan stomata pada siang hari untuk menghambat transpirasi dan membuka pada malam hari untuk menyerap  $CO_2$  (Ting, 1985). Tipe kedua adalah *CAM-idling*, yaitu tanaman CAM yang melakukan penutupan stomata pada siang hari dan malam hari untuk menghambat transpirasi pada saat cekaman lingkungan (Bastide *et al.*, 1993). Tipe ketiga dari tanaman CAM adalah *CAM facultative*, yaitu tanaman yang merubah jalur fiksasi karbonnya dari  $C_3$  ke CAM sebagai tanggapan terhadap tingkat pertumbuhan dan perkembangan tanaman atau kondisi lingkungan seperti fotoperiode, kegaraman tinggi atau kekurangan air (Chushman dan Bohnert, 1997).

Sebagai contoh tanaman CAM adalah *Mesembryanthemum crystallinum*, merupakan fakultatif halofit yang tanggap terhadap cekaman air dalam keadaan kekeringan atau kegaraman tinggi dengan pengalihan mekanisme fotosintesis dari  $C_3$  ke CAM (Chushman dan Bohnert, 1997).

Perubahan tersebut juga menyangkut munculnya gen penyandi PEPC selama cekaman kegaraman. Dengan pemberian 0,5 molar NaCl terjadi peningkatan aktivitas PEPC (Schmitt *et al.*, 1987). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa cekaman kegaraman atau kekurangan air akan meningkatkan aktivitas enzim asimilasi karbon tersebut, sehingga pertumbuhan tanaman CAM akan lebih baik dibandingkan kondisi tanpa cekaman.

## 2.2 Pengaruh Kegaraman Terhadap Fisiologi Tanaman

Cekaman garam pada tanaman akan berakibat langsung pada perubahan struktur dan konfigurasi protein. Selama tanaman mengalami cekaman kegaraman

maka beberapa gen akan terlibat aktif untuk beradaptasi terhadap cekaman tersebut (Strocher *et al.*, 1995). Salah satu mekanisme fisiologis tanaman dalam menanggapi kondisi lingkungan yang ekstrem seperti kegaraman tinggi dan kekurangan air adalah dengan meningkatkan akumulasi senyawa-senyawa *osmoregulation* seperti asam amino prolin, betaine, ataupun karbohidrat (Salisbury dan Ross, 1991).

Salinitas menyebabkan translokasi hasil fotosintesis rendah, laju respirasi meningkat, potensial osmotik menurun sehingga energi yang dibutuhkan untuk menyerap air lebih besar akibat energi hasil fotosintesis lebih banyak yang dirombak yang akhirnya menghambat laju pertumbuhan tanaman yang tumbuh pada kondisi kadar garam tinggi pada tengah hari stomata akan menutup dan terjadi penurunan fiksasi  $\text{CO}_2$ , tetapi masih dapat melakukan transport elektron keluar (Ramzi *et al.*, 1995).

Pengaruh stres garam ini juga berpengaruh pada pola sintesa protein pada akar Barley. Perubahan dalam jaringan sintesis protein yang disebabkan oleh NaCl yang ditranslasikan oleh mRNA mungkin akan dihambat atau dirangsang karena dinaikkannya konsentrasi NaCl sitoplasma. Untuk mengetahui efek dari ion-ion ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) dan kekompakan bahan organik terlarut (prolin, glysine, betaine) secara translasi *in vitro* pada mRNA yang diisolasi dari tanaman toleran dan sensitif terhadap garam memperlihatkan sintesis protein dihambat oleh substitusi dari  $\text{Na}^+$  untuk  $\text{K}^+$  atau dari  $\text{Cl}^-$  untuk asetat pada konsentrasi diatas 80 mM. Ditambahkan sintesis relatif dari polipeptida dirubah ketika  $\text{Na}^+$  atau  $\text{NH}_4^+$  sebagian disubstitusikan untuk  $\text{K}^+$  dimana keberadaan polypeptida ini untuk disintesa oleh RNA plastida (Hurkman dan Tanaka, 1995).

Pada penelitian yang menggunakan tanaman CAM *Portulacaria afra* dilaporkan, bahwa cekaman kegaraman, perlakuan dengan ABA dapat menghasilkan perubahan karboksilasi dari jalur  $\text{C}_3$  ke CAM dan peningkatan aktivitas PEPC (Ting, 1985). Hal ini mungkin terjadi karena ABA diproduksi sebagai respon terhadap cekaman garam ataupun air yang merangsang produksi mRNA PEPC dan protein dari tanaman CAM *Xerosicyos danguyi* H. Humb. Pada penelitian ini juga dilaporkan, bahwa pada jaringan yang respon terhadap cekaman terdapat akumulasi ABA yang lebih tinggi dibanding kontrol (Bastide *et al.*, 1993).

Dari penelitian lain dilaporkan bahwa peningkatan kandungan hormon ABA ada hubungannya dengan cekaman lingkungan. Akumulasi ABA akan meningkat apabila pada tanaman diperlakukan cekaman kegaraman dan kekeringan (Zeevart dan Creelman, 1988). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa cekaman kegaraman dan kekeringan akan meningkatkan akumulasi ABA dan lebih lanjut dapat meningkatkan aktivitas PEPC. Peningkatan aktivitas PEPC akan meningkatkan asimilasi karbon dan pertumbuhan tanaman CAM.

## 2.2 Ekspresi dan Regulasi PEPC pada Tanaman CAM

PEPC (*Phosphoenolpyruvate Carboxylase*) pada tanaman  $C_4$  dan CAM, berperan mengkatalisis PEP (*Phosphoenolpyruvate*) dalam fiksasi  $CO_2$  membentuk *oxaloacetate* (OAA). PEPC mempunyai afinitas terhadap  $CO_2$  lebih besar daripada Rubisco (*Ribulose bis-phosphat Carboxylase*), sehingga enzim ini dapat bekerja lebih efisien dalam konsentrasi  $CO_2$  rendah. Sedangkan Rubisco yang terdapat pada tanaman  $C_3$  dan  $C_4$ , berperan mengkatalisis *ribulose bis-phosphat* (RuBP) dalam fiksasi  $CO_2$  membentuk *3-Phospho Glyceric Acid* (3-PGA). Selain terhadap  $CO_2$ , Rubisco juga mempunyai afinitas terhadap  $O_2$  (Gardner *et al.*, 1985).

Pada beberapa tanaman  $C_4$  seperti jagung, dilaporkan bahwa aktivitas PEPC berkorelasi positif dengan pertumbuhan tanaman. Peningkatan aktivitas PEPC akan meningkatkan pertumbuhan tanaman  $C_4$  (Sugiyama *et al.*, 1986; Richard *et al.*, 1987; Sugiharto *et al.*, 1992). Dengan demikian peningkatan aktivitas PEPC pada tanaman CAM diduga dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman tersebut.

PEPC pada tanaman  $C_4$  aktif pada siang hari, tetapi pada tanaman CAM aktif pada malam hari (Sugiyama dan Huber, 1986). Hal ini bisa dimengerti karena aktivitas PEPC tampak maksimal dan  $K_m$  (PEP) minimum saat pH rendah (Bastide *et al.*, 1993), dengan afinitas maksimal pada temperatur  $17^\circ C$  dan peningkatan  $V_{maks}$  pada peningkatan temperatur dari  $10 - 35^\circ C$  (Wu dan Wedding, 1987).

Pada tanaman CAM, gen penyandi PEPC ada dua yaitu, *ppc1* dan *ppc2*. Gen *ppc1* merupakan gen penyandi PEPC untuk asimilasi karbon, sedangkan gen *ppc2* penyandi PEPC yang berperan dalam respirasi. Transkripsi gen *ppc1* meningkat saat terjadi cekaman air sedangkan pada periode yang sama transkripsi gen *ppc2* menurun

dalam jaringan daun (Chusman *et al.*, 1989). Pengaturan ekspresi gen spesifik tanaman CAM terutama terjadi pada tingkat transkripsi. Uji *Run-off-Transcription* dengan isolasi inti dari sel daun *Mesembryanthemum crystallinum* menunjukkan bahwa transkripsi gen tersebut meningkat 2 sampai 6 kali lipat saat tanaman diperlakukan dengan kondisi kegaraman tinggi (Chusman *et al.*, 1989; Forsthoefel *et al.*, 1995). Pada tanaman *Mesembryanthemum crystallinum* jumlah pola cetakan *ppc1* sebanding dengan akumulasi protein PEPC. Hal ini menunjukkan bahwa induksi PEPC mungkin dikontrol oleh jumlah mRNA dan bukan oleh tingkat translasi (Chusman *et al.*, 1990).

PEPC dari tanaman CAM berada dalam dua bentuk yang inkonvertibel pada waktu yang berbeda. Pada malam hari berada pada bentuk tetramer, sehingga PEPC mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap PEP dan juga tahan terhadap penghambatan oleh malat. Di siang hari berada pada bentuk dimer yang mempunyai afinitas rendah terhadap PEP dan sangat peka terhadap penghambatan oleh malat (Wu dan Wedding, 1987).

Perlakuan ABA pada konsentrasi 5 – 10 mikromolar pada daun atau akar pada tanaman kultur hidroponik atau tanah dapat menginduksi ekspresi CAM pada siang hari. Setelah perlakuan tersebut juga terjadi peningkatan aktivitas PEPC dan NADP (*Nicotinamid Adenin Dinukleotida Phosphat*) malat. Dengan analisis elektroforesis terhadap protein terlarut dari daun, menunjukkan peningkatan aktivitas PEPC selama induksi ABA. Meningkatnya jumlah protein enzim sejalan dengan meningkatnya cekaman kegaraman dan air dalam tanah (Chu *et al.*, 1989).

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di rumah kaca Fakultas Pertanian Universitas Jember dengan ketinggian lahan  $\pm 89$  m dpl dan di Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Desember 1998 sampai bulan Desember 1999.

#### 3.2 Bahan dan Alat

##### 3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain; media pasir, timba plastik, tanaman nanas (*Ananas comosus*), nitrocellulose membrane, reagen-reagen kimia produk Sigma (USA) dan produk E-Merck (Jerman).

##### 3.2.2 Alat

Alat yang digunakan antara lain ; mortar-stumper, sentrifuge otomatis, spektrofotometer UV/ VIS, Lemari pendingin, sephadex G-25, tabung reaksi, mikro pipet, PH-Meter (Horiba), biuret, magnetik stirer, eksikator, kompor listrik, waterbath 100°C, Electroforesis dan lain-lain.

#### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dihitung menggunakan persamaan regresi ,dan kombinasi perlakuan sebagai berikut :

1. Tanaman nanas pada kondisi normal (kontrol)
2. Tanaman nanas pada stres NaCl 0,25 M
3. Tanaman nanas pada stres NaCl 0,50 M

#### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

##### 3.4.1 Penanaman

Penelitian dilakukan dengan menumbuhkan lima belas bibit tanaman nanas (*Ananas comosus* L.) pada media pasir dalam pot yang ditambahkan larutan nutrisi

yaitu setengah konsentrasi larutan Hougland pada kisaran pH 6,5 - 7. Selanjutnya tanaman dipelihara selama  $\pm$  6 bulan sesuai cara bercocok tanam, sampai pertumbuhan tanaman diperkirakan normal dan seragam.

#### 3.4.2 Perlakuan Cekaman Kegaraman

Setelah tanaman berumur 6 bulan, diberikan perlakuan stres kegaraman dengan mengalirkan separuh konsentrasi larutan Hougland tanpa NaCl (kontrol); separuh konsentrasi larutan Hougland yang mengandung 0,25 M NaCl; dan 0,50 M NaCl. Setelah perlakuan stres selama 12 hari dilakukan pengambilan sampel daun nomor 3 sampai dengan nomor 10 dari pucuk tanaman nanas (daun nomor 3 dari pucuk umur fisiologisnya lebih muda dari daun nomer 10) dan menganalisisnya.

#### 3.4.3 Ekstraksi dan Pengukuran Aktivitas PEPC

Untuk pengukuran aktivitas PEPC diambil daun nomer 3 dari pucuk sampai dengan daun nomor 10. Masing-masing daun dipotong bagian tengah kemudian diekstrak dengan mencampur  $N_2$  cair serta menambahkan 2,5 kali berat/volume (b/v) larutan buffer ekstraksi yang mengandung 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 % glyserol, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $Na_2$ -EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 5% b/v PVP (Polyvynilpolypirrolidone), Protease inhibitors 800  $\mu$ L/ 200 ml. Untuk memisahkan crude ekstrak dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm  $4^\circ C$  selama 5 menit. Supernatant yang diperoleh dilewatkan spandex G-25. Analisa aktivitas enzim PEPC dengan alat spektrofotometer  $\lambda = 340$  dengan komposisi larutan 300  $\mu$ L assey mixer, 50  $\mu$ L DTT, 50  $\mu$ L NADH, 20  $\mu$ L MDH, 480  $\mu$ L  $H_2O$ , 50  $\mu$ L sampel protein. Satu unit aktivitas PEPC dinyatakan dalam besarnya (jumlah) NADH yang teroksidasi per menit per gram protein terlarut.

#### 3.4.4 Analisa Kandungan Total Protein Terlarut

Kandungan protein terlarut ditentukan dengan menggunakan metode Bradford. Pengukuran total protein dilakukan dengan menambahkan 20  $\mu$ L sampel, 30  $\mu$ L aquades, 1000  $\mu$ L larutan Bradford, divortex, selanjutnya diinkubasi selam 5 menit, kandungan protein diukur dengan spektrofotometer  $\lambda = 595nm$ . Besarnya

kandungan protein terlarut dihitung dengan membandingkan standart protein bovin serum albumin (BSA)

#### 3.4.5 Analisa Keasaman Jaringan

Analisa keasaman jaringan diawali dengan memotong 5 gr bagian tengah dari panjang daun dan diekstrak dengan menambahkan 20 mL H<sub>2</sub>O dingin (sebelumnya air dipanaskan sampai mendidih selama 10 menit supaya terbebas dari CO<sub>2</sub>). Crude ekstrak dipisahkan dengan sentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit, supernatant yang dihasilkan diukur volumenya dan disimpan 10 mL untuk diukur pH-nya, titrasi dengan NaOH sampai pH 7,5. Keasaman jaringan jaringan dinyatakan dengan  $\mu\text{eq/g}$  berat basah sampel.

#### 3.4.6 Analisa Western Blot

Protein diperoleh dari ekstrak daun tanaman nanas nomer 8 dari pucuk tanaman. Daun tanaman diambil 5gr digerus dengan menambahkan N-cair dan menambahkan 3 kali (b/v) buffer yang mengandung 0,2 M Tris- HCl, pH 7,5; 0,1 M KCl; 0,05 M Na-EDTA, pH 7,4; 2 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 0,3 % SDS; 0,7 M sucrose dan 5 % (b/v) PVP, selanjutnya menambahkan 10 mL phenol dan memvortek hingga homogen. Selanjutnya mensentrifuge pada 12.000 rpm/ 15 menit. Kemudian mengumpulkan protein bagian atas dan pekerjaan ini diulang tiga kali. Selanjutnya tahap pengendapan dengan menambahkan 100 % methanol yang mengandung 0,1 M amonium acetat dan diinkubasi sehari.

Pelet disentrifus pada 12.000 rpm/ 5 menit dan dicuci dengan methanol, selanjutnya dicuci lagi tiga kali dengan aceton yang mengandung 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Mengering anginkan pelet kemudian menambahkan buffer lysis yang mengandung 60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % glycerol; 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol; 2 % SDS. Kemudian memvortex dan mensentrifuge 10.000 rpm/ 5 menit. Kemudian menambahkan sampel dengan 1:1 buffer tranfer yang menganung 60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % glycerol; 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol; 2 % SDS dan 0,01 phenol red. Selanjutnya mengambil sesuai kebutuhan dengan memanaskan dalam 100°C selama 3 menit dan sampel siap diaplikasikan.

Membuat gel elektroforesis 12,5 % dan loading protein 80  $\mu\text{g}$ / lane dielektroforesiskan dengan SDS-PAGE (sodiumdodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis). Sesudah elektroforesis protein dalam gel ditransfer ke nitrocellulose membrane menggunakan wet blotter dan Tris-buffer yang mengandung methanol. Protein pada membrane diinkubasikan dengan antibodi PEPC atau Rubisco. Setelah diinkubasi dengan antibodi kedua (alkaline phosphatase-IgG conjugate) protein PEPC atau Rubisco divisualisasikan dengan 50  $\mu\text{L}$  BCIP dan 50  $\mu\text{L}$  NBT.

#### 3.4.7 Analisa Kandungan Asam Amino Prolin

Kandungan asam amino prolin diukur dengan metode Bates (Bates, 1973). Pengukuran kandungan asam amino prolin diawali dengan mengekstrak sampel daun sebanyak 2 gr dengan menambahkan 6 ml sulfosalisilic acid 3%. Homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm/ 8 menit. Supernatant yang diperoleh diambil 2 ml dan menambahkan 2 ml ninhydrin acid (yang mengandung 1,25 ninhydrin dalam 30 ml asam asetat glasial, 20 ml 6 M Phosporic acid daya tahan sehari), 2 ml asam asetat glasial, dan 2 ml asam asetat glasial serta menutup tabung reaksi, kemudian menginkubasi dalam air panas 100°C, setelah 1 jam segera mendinginkannya dengan merendam dalam es. Setelah menambahkan 4 ml toluen, dan selanjutnya mengukur konsentrasi kandungan asam amino prolin dengan spektrofotometer VIS dengan panjang gelombang 520 nm. Sebagai pembanding digunakan standart asam amino prolin.

#### 3.5 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati antara lain :

1. Aktivitas PEPC
2. Kandungan PEPC dan Rubisco (analisa Western blot)
3. Keasaman Jaringan Daun
4. Akumulasi asam amino prolin

## V. KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan diatas dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Peningkatan konsentrasi NaCl dan umur fisiologis daun akan meningkatkan aktivitas PEPC yang diikuti oleh peningkatan total keasaman jaringan dan peningkatan konsentrasi NaCl yang meningkat akan menurunkan kandungan PEPC dan Rubisco pada tanaman nanas.
2. Selama stres NaCl akumulasi asam amino prolin cenderung tidak mengalami perubahan, diduga senyawa asam amino prolin bukan senyawa osmoprotektan dominan yang muncul pada kondisi stres keagamaan pada tanaman nanas.

### 5.2 Saran

Setelah terselesainya penelitian ini saya sarankan bagi penelitian selanjutnya, bahwa bila meneliti karakter aktivitas PEPC, hendaknya diteliti juga enzim lain yang berhubungan erat yaitu NADP-ME dan Rubisco baik kandungan dan aktivitasnya dari posisi daun yang termuda sampai teroptimum.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.W., and J. Beardall, 1991, **Molecular Activities of Plant Cell and Introduction to Plant Biochemistry**, Blackwell Scientific Publication, London, 384p.
- Bastide, B., D. Sipes, J. Hann, and I.P. Ting, 1993, Effect of severe water stress on aspect of Crassulacean acid metabolism in *Xerosicyos*, **Plant Physiol** 103 : 1089-1096.
- Chu, C., Z. Dai, M.S.B. KU and G.E. Edwards, 1990, Induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid, **Plant Physiol** 93: 1253-1260.
- Chusman, J.C., and H.J. Bohnert, 1997, Molecular genetics of Crassulacean acid metabolism, **Plant Physiol** 113 : 667-676.
- Chusman, J.W., C.B. Michalowski, and H.J. Bohnert, 1990, Developmental control of Crassulacean acid metabolism inducibility by salt stress in the common ice plant, **Plant Physiol** 94 : 1137-1142.
- Chusman, J.W., C.B. Michalowski, G. Meyer, J.M. Schmitt, and H.J. Bohnert, 1989, Salt stress leads to differential expression of two isogenes of Phosphoenolpyruvate carboxylase during Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant, **Plant Cell** 1: 715-725.
- Forsthoefel, N.R., M.A. Chusman and S.C. Chusman, 1995, Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Plant Physiol** 108 : 1185-1195.
- Furbank, R.T., and W.C. Taylor, 1995, Regulation of photosynthesis in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants : a molecular approach, **Plant Cell** 7: 797-807.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce, and R.L. Mitchell, 1985, **Physiology of Crop Plants**, The Iowa State University Press.
- Hurkman, W.J., and C.K. Tanaka, 1987, The effect of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots, **Plant Physiol** 83 : 517-524.
- Noggle, G.R., and G.J. Fritz, 1979, **Introductory Plant Physiology**, Prentice Hall of India Private Limited, New Delhi.

- Ramzi, B., H. Medrano, A. Abidia and J. Abadia, 1995, Effects of salinity on photosynthetic parameter of Barley (*Hordeum vulgare* L.), Growth under a triple line source sprinkler system in the field, **Photosynthesis : from Light to Biosphere IV**: 753-756.
- Richard, C.L., and H.D. Doncaster, 1987, Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase activity in maize leaves, **Plant Physiol** 84 : 82-87
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross, 1991, **Plant Physiology**, Wadsworth Publishing Company Belmont, California.
- Schmitt, J.M., and M. Piepenbrock, 1992, Regulation of PEPC and Crassulasean acid metabolism induction in *Mesembryanthemum Crystallinum* L. by cytokinin, **Plant Physiol** 99 : 1664-1669.
- Strocher, V.L., J.G. Boothe, and A.G. Good, 1995, Molecular cloning and expression of a turgor-responsive gene in *Brassica napus*, **Plant Molecular Biology** 27 : 541-551.
- Ku, M.S.B., Y. Kano-Murakami, and M. Matsuoka, 1996, Evolution and expression of C<sub>4</sub> photosynthesis genes, **Plant Physiol** 111 : 949-957.
- Sugiharto, B., J.N. Burnell and T. Sugiyama, 1992, Cytokinin is required to induce the nitrogen-dependent accumulation of mRNAs for Phosphoenolpyruvate carboxylase and Carbonic anhydrase in detached maize leaves, **Plant Physiol** 100 : 153- 56.
- Sugiyama, T. , and S.C. Huber, 1986, Change in sensitivity to effectors of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase during light/dark transition, **Plant Physiol** 81 : 674-677.
- Sugiyama, T. , M. Mizuno, M. Hayashi, 1984, Partitioning of nitrogen among ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase, phosphoenol carboxylase and pyruvate orthophosphate dikinase as related to biomass productivity in maize seedling. **Plant Physiol** 75: 665-669.
- Taiz, L., and E. Zeiger, 1991, **Plant Physiology**, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC, California.
- Ting, I.P., 1985, Crassulacean Acid Metabolism, **Ann. Rev. Plant Physiol** 36: 595-622.
- Wu, M.X., and R.T. Wedding, 1987, Regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*, **Plant Physiol** 84 : 1080-1083.