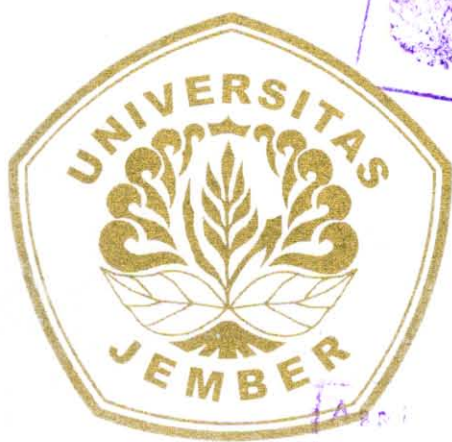


**AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE DAN GLUTAMIN
SINTHETASE PADA KLON TEBU GENJAH DAN NON GENJAH
SERTA RESPONNYA TERHADAP PEMUPUKAN NITROGEN**

SKRIPSI

Diajukan Untuk Memenuhi Persyaratan Program Sarjana Sains
Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember



Oleh :

Imelda Henganing Ayu
NIM. 981810401039

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
SEPTEMBER, 2003**

MOTTO

*Allah mengetahui apa yang dihadapan mereka dan apa yang dibelakang mereka. Dan hanya kepada Allah dikembalikan semua urusan
(Al-Hajj : 76)*

*Kemenangan hanya dapat diraih dengan kesabaran
(HR. at – Tirmidzi)*

Sesungguhnya keberhasilan anda hanya dapat dicapai bila anda dikelilingi oleh orang-orang yang mencintai anda (Imelda)

Permata hati anda adalah orang yang selalu menuntun dan mendukung anda untuk mencapai apa yang anda yakini (Imelda)

*Tak tahu, belajarlah
Tak bisa, bersungguh-sungguhlah
Mustahil, cobalah (Napoleon)*

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah aku panjatkan kehadiran-Mu Ya Allah atas rahmat yang telah Engkau berikan, serta Rasulullah SAW yang telah memberikan jalan Islam kepadaku, sehingga Karya Ilmiah Tertulis ini dapat terselesaikan. Dan dengan segenap rasa cinta yang tulus Karya sederhana ini aku persembahkan untuk:

- ❖ *Ayahanda Supardikin dan Ibunda Nur Wachidah yang telah mengiringi langkahku dengan do'a dan mencurahkan rasa cinta, kasih sayang serta kesabaran dalam membimbingku sejak aku lahir. Suatu kebahagiaan menjadi putrimu dan usaha ananda untuk jadi yang terbaik ananda persembahkan hanya untukmu.*
- ❖ *Suamiku tercinta M. Tri Mulyadi yang telah memberikan naungan kasih, perhatian dan pengertian. Suatu kebahagiaan menjadi pendamping hidupmu, sayang.*
- ❖ *Permata hatiku, M. Daffa Melferynanda yang selalu menemaniku dan memberiku semangat hidup.*
- ❖ *Adik-adikku Anna, Lia, Aji, Nisa dan Fadliil, serta kakakku Mbak Rifa. Hanya kelucuan kalian yang dapat menghilangkan kejenuhanku.*
- ❖ *Sahabat-sahabatku. Kalem 70: Sofy, Lia, Ira, Indra, Tias, Lucky, Della, Erna, Heni, Tantin, Wiwit.*
- ❖ *Teman-temanku angkatan 98: Dian, Dwijo, Verda, Amien, Lila, Retno, Ryan, Nurul, Yunita, Erika.*
- ❖ *Almameter yang kubanggakan.*

DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil penelitian mulai bulan Maret 2002 sampai dengan bulan Juli 2002 di Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember dan Rumah Kaca Fakultas Pertanian Universitas Jember. Bersama ini saya menyatakan bahwa isi skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri kecuali jika disebutkan sumbernya. Penelitian ini juga belum pernah diteliti dan dipublikasikan sebelumnya.

Jember, September 2003

Imelda Henganing Ayu

ABSTRAK

Aktivitas nitrat reduktase dan glutamin sintetase pada Klon Tebu Genjah dan Non Genjah serta Responnya Terhadap Pemupukan Nitrogen, Imelda Henganing Ayu, 981810401039, Skripsi, Mei 2003, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Aktivitas nitrat reduktase (NR) dan glutamin sintetase (GS), sebagai enzim asimilasi nitrogen yang berperan dalam proses pembentukan asam amino, diukur dan dibandingkan pada dua klon tebu, yaitu klon tebu genjah PSTG 87-22643 dan non genjah M 442-51. Parameter utama yang diamati yaitu aktivitas NR dan GS, parameter tambahan meliputi kandungan TPT dan klorofil, biomassa dan tinggi tanaman. Perlakuan beberapa dosis pupuk N diberikan untuk mengetahui respon aktivitas enzim NR dan GS pada kedua klon tebu. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi mengenai aktivitas NR dan GS pada klon tebu genjah dan non genjah serta responnya terhadap pemberian pupuk N. Dosis pupuk N yang diperlakukan adalah 0 kg N/ha, 50 kg N/ha, 100 kg N/ha dan 150 kg N/ha. Aktivitas NR dan GS klon tebu non genjah M 442-51 lebih tinggi dibanding tebu genjah PSTG 87-22643. Aktivitas NR dan GS kedua klon tebu dipengaruhi oleh perlakuan dengan pemupukan N, yang semakin meningkat dengan meningkatnya dosis pemupukan N yang diberikan. Aktivitas NR tertinggi pada klon tebu genjah terjadi pada hari ke-9 setelah pemupukan yaitu sebesar 1.885 $\mu\text{Mol}/\mu\text{g}$ TPT/menit pada dosis 150 kg N/ha, sedangkan pada klon tebu non genjah terjadi pada hari ke-6 setelah pemupukan yaitu sebesar 2.905 $\mu\text{Mol}/\mu\text{g}$ TPT/menit pada dosis 150 kg N/ha. Kedua klon tebu mempunyai aktivitas NR terendah dengan pemupukan 0 kg N/ha. Aktivitas GS pada klon tebu genjah mempunyai nilai tertinggi sebesar 0.726 $\mu\text{Mol}/\mu\text{g}$ TPT/menit, dengan pemupukan 150 kg N/ha. Sedangkan tebu non genjah mempunyai aktivitas GS tertinggi juga dengan pemupukan 150 kg N/ha yaitu sebesar 1.722 $\mu\text{Mol}/\mu\text{g}$ TPT/menit. Kedua klon tebu mempunyai aktivitas GS terendah dengan pemupukan 0 kg N/ha. Aktivitas NR, aktifitas GS, total protein terlarut, kandungan klorofil semakin meningkat dengan meningkatnya dosis pupuk N yang diberikan. Sedangkan biomassa dan tinggi tanaman pada kedua klon tebu memberikan hasil berbeda tidak nyata terhadap perlakuan pemupukan yang diberikan. Pada semua parameter penelitian di atas, tebu non genjah mempunyai nilai lebih tinggi, kecuali pada parameter kandungan klorofil.

Kata kunci : nitrat reduktase, glutamin sintetase, tebu, genjah, non genjah, asimilasi nitrogen, pupuk N.

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada :

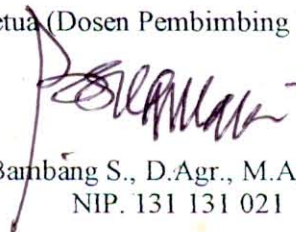
Hari : KAMIS

Tanggal : 09 OCT 2003

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua (Dosen Pembimbing Utama)



(Bambang S., D.Agr., M.Agr., Ir.)
NIP. 131 131 021

Sekretaris (Dosen Pembimbing Anggota)

(Ir. Sumadi, MS.)
NIP. 130 368 784

Anggota I



(Drs. Anton Paidi, MS)
NIP. 130 368 785

Anggota II



(Esti Utarti, S.P., M.Si.)
NIP. 132 243 344

Mengesahkan

Dekan FMIPA UNEJ



(Ir. Sumadi, MS.)
NIP. 130 368 784

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas selesainya penulisan skripsi yang berjudul “Aktivitas *nitrat reduktase* dan *glutamin sintetase* pada Klon Tebu Genjah dan Non Genjah serta Responnya terhadap Pemupukan Nitrogen”.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Bambang Sugiharto, D.Agr., M.Agr.,Ir., dan Ir. Sumadi, MS., sebagai Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak memberikan bimbingan kepada penulis.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ir. Atik Suryani atas kerjasamanya dan semua pihak yang telah ikut membantu sehingga dapat diselesaikannya skripsi ini.

Semoga segala yang tertuang dalam karya ini dapat bermanfaat bagi para peneliti khususnya dan bagi para pembaca pada umumnya.

Jember, September 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman motto	ii
Halaman Persembahan	iii
Deklarasi	iv
Abstrak	v
Halaman pengesahan	vi
Kata Pengantar	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	x
Daftar Gambar	xi
Daftar Lampiran	xii
Daftar Singkatan	xiii
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Karakteristik Tanaman Tebu	4
2.2 Asimilasi N serta Peranan Enzim NR dan GS	5
2.3 Hubungan Aktivitas NR dengan Pertumbuhan Tanaman	7
2.4 Peranan Unsur N Dalam Tanaman	8
III. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	9
3.2 Bahan dan Alat	9
3.3 Rancangan Percobaan	9
3.4 Pelaksanaan Penelitian	10
3.4.1 Pertumbuhan Tanaman	10

3.4.2 Persiapan Bahan.....	10
3.4.3 Ekstraksi Enzim.....	10
3.4.4 Pengukuran Aktivitas Enzim NR.....	11
3.4.5 Pengukuran Aktivitas Enzim GS.....	11
3.4.6 Penentuan Kandungan Total Protein Terlarut.....	11
3.4.7 Penentuan Kandungan Klorofil.....	12
3.4.8 Penentuan Biomassa dan Tinggi Tanaman.....	12
3.5 Parameter.....	12
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Respon Aktivitas NR Terhadap Pemupukan Nitrogen.....	13
4.2 Respon Aktivitas GS Terhadap Pemupukan Nitrogen.....	15
4.3 Kandungan Total Protein Terlarut dan Klorofil.....	17
4.4 Biomassa Tanaman.....	20
4.5 Tinggi Tanaman.....	22
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	25
5.2 Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	28

DAFTAR TABEL

No.		Halaman
1.	Kandungan Total Protein Terlarut pada Klon Tebu Genjah Dan Non Genjah	18
2.	Kandungan Klorofil pada Klon Tebu genjah dan non Genjah..	19
3.	Anova Biomassa Tanaman.....	20
4.	Hasil Uji Duncan Biomassa Tanaman pada taraf 5%.....	20
5.	Anova Tinggi Tanaman.....	23
6.	Hasil Uji Duncan tinggi Tanaman pada Taraf 5%.....	23

DAFTAR GAMBAR

No.		Halaman
1.	Asimilasi ammonia melalui <i>glutamate synthase cycle</i>	7
2.	Peningkatan aktivitas NR pada klon tebu genjah dan non genjah akibat pemupukan nitrogen.....	14
3.	Peningkatan aktivitas GS pada klon tebu genjah dan non genjah akibat pemupukan nitrogen.....	17
4.	Pengaruh dosis pemupukan nitrogen terhadap biomassa tanaman pada klon tebu genjah dan non genjah.....	22
5.	Pengaruh dosis pemupukan nitrogen terhadap tinggi tanaman pada klon tebu genjah dan non genjah.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1. Perhitungan Dosis Pupuk per Hektar	28
2. Tata Letak Percobaan	29
3. Perhitungan kebutuhan Pupuk per Polybag	30
4. Rata-rata Biomassa Tanaman	31
5. Rata-rata Tinggi Tanaman	32

DAFTAR SINGKATAN

ADP	: Adenosin di-phospat
ATP	: Adenosin tri-phospat
BSA	: Bovine Serum Albumine
β -ME	: β -mercaptoethanol
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylenediamine Tetraacetid Acid
Fd	: Ferredoxin
FeCl ₂	: Ferum di-chloride
gfw	: Gram <i>fresh weight</i> (berat segar)
GS	: Glutamin Sinthetase
GOGAT	: Glutamat Oxoglutarat Aminotransferase
HCL	: Hidrochloride
KNO ₃	: Kalium Nitrat
KP ₁	: Kalium orthophospat
MgCl ₂	: Magnesium Klorida
NH ₂ OH	: Ammonium Hidroksida
NiR	: Nitrit Reduktase
NR	: Nitrat Reduktase
NADH	: Nicotinamide Adenin Dinucleotide
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PVP	: Polyvinyl Phyrolidone
SPS	: Sucrose Phosphate Synthase
TCA	: Tricarboxylic acid

1 c Cl₂
F



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum L.*) merupakan tanaman penghasil sukrosa yang digunakan untuk memproduksi gula. Meningkatnya kebutuhan penduduk akan konsumsi gula mendorong peningkatan produksi tebu. Menurut Sukarso *et al.*, (1992) produksi per satuan waktu dapat meningkat antara lain dengan penggunaan varietas tebu dengan ciri genjah.

Varietas tebu genjah yaitu tebu yang pada umur 6-7 bulan telah memiliki kandungan gula total cukup tinggi sehingga bisa dipanen untuk mengatasi rendemen yang rendah pada awal giling (Marjayanti dan Arsana, 2000). Empat jenis yang menonjol yaitu PSTG 87-22643, PSTG 87-2378, PSTG 87-22870 dan PSTG 87-22953, pada umur 7 bulan mempunyai kandungan gula total berturut-turut 20.56, 20.17, 19.40 dan 21.38 %. Dibandingkan tebu genjah, varietas tebu non genjah mempunyai kandungan gula total lebih rendah dan hanya dapat dipanen pada umur diatas 10 bulan. Tebu non genjah M 442-51 dan F 154 pada umur 10 bulan mempunyai kandungan gula total berturut-turut 15.49 dan 17.51 % (Sukarso *et al.*, 1992). Walaupun telah diketahui bahwa tebu genjah mempunyai kandungan gula total lebih tinggi, namun pertumbuhan tebu genjah terutama tinggi tanaman tidak berbeda nyata dengan tebu non genjah. Penelitian Marjayanti dan Arsana (2000) menunjukkan bahwa tinggi batang tebu genjah pada umur 6 bulan 218.33 cm sedangkan tebu non genjah dapat mencapai 227.00 cm. Pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa potensi hasil tebu per ha pada tebu genjah yaitu sebesar 83.40 ton/ha sampai dengan 86.10 ton/ha, sedangkan pada tebu non genjah dapat mencapai 91.20 ton/ha sampai dengan 108.40 ton/ha. Hal ini menunjukkan bahwa tebu non genjah mempunyai potensi hasil tebu yang lebih tinggi dibanding tebu genjah.

Pertumbuhan tanaman berhubungan dan berkorelasi positif dengan aktivitas enzim asimilasi nitrogen, yaitu *nitrat reduktase* (NR). NR merupakan salah satu enzim asimilasi N yang berperan secara langsung dalam pembentukan asam amino. NR juga merupakan enzim pertama dalam jalur asimilasi nitrat dan

menjadi pembatas laju reduksi nitrat (NO_3^-) menjadi amonia (NH_3), dengan demikian mengatur ketersediaan nitrogen tereduksi oleh tanaman (Croy dan Hageman, 1970). Dengan kata lain NR juga mengatur laju sintesis senyawa-senyawa nitrogen tanaman.

Selain NR, *glutamin synthetase* (GS) juga merupakan enzim yang berperan dalam proses asimilasi N dan pembentukan asam amino. Amonia (NH_3) sebagai produk akhir dari asimilasi nitrat, oleh GS akan disintesis menjadi bentuk asam amino glutamin dan selanjutnya akan diubah menjadi protein dan asam nukleat yang sangat dibutuhkan bagi pertumbuhan tanaman (Lea, 1999).

Pertumbuhan tanaman ditentukan oleh kerjasama antara faktor genetik dan faktor di dalam lainnya dengan lingkungan, seperti pemupukan N. Di dalam jaringan tanaman, N merupakan komponen penyusun dari banyak senyawa penting bagi pertumbuhan tanaman. Umumnya tanaman menyerap unsur N dari tanah dalam bentuk nitrat (NO_3^-) dan amonium (Beever dan Hageman, 1969). Unsur nitrogen juga merupakan regulator gen *phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPC), *nitrate reductase* (NR), *nitrite reductase* (Sugiharto *et al.*, 1992), *light harvesting complex protein* (LHCP) serta klorofil a/b (Gardner *et al.*, 1985). Mengingat peranan penting enzim NR dan GS terhadap asimilasi N dan pertumbuhan tanaman, maka aktivitas NR dan GS serta responnya terhadap pemupukan N pada klon tebu genjah dan non genjah perlu diketahui.

1.2 Rumusan Masalah

Unsur N adalah bahan penyusun asam amino, amida dan nukleo protein yang sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman. Sintesis N di dalam jaringan tanaman dikatalisis oleh beberapa enzim antara lain NR dan GS. NR merupakan enzim pembatas terhadap laju pengaturan asimilasi nitrat pada awal reaksinya, sedangkan GS berperan mengasimilasi amonia menjadi bentuk asam amino glutamin yang sangat penting untuk pertumbuhan tanaman. Keberadaan unsur N akan mempengaruhi aktivitas NR dan GS dalam jaringan tanaman. Hal ini mendorong peneliti untuk melakukan penelitian terhadap aktivitas enzim asimilasi N (NR dan GS) pada klon tebu genjah dan non genjah serta responnya terhadap

pemupukan N. Dari uraian tersebut diatas, akan memunculkan suatu permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana respon aktivitas enzim NR pada klon tebu genjah dan non genjah terhadap pemupukan unsur N?
2. Bagaimana respon aktivitas enzim GS pada klon tebu genjah dan non genjah terhadap pemupukan unsur N ?

1.3 Tujuan dan Manfaat

Hasil dari penelitian ini diharapkan akan diperoleh informasi mengenai perbandingan aktivitas enzim asimilasi N yaitu NR dan GS pada klon tebu genjah dan non genjah serta responnya terhadap pemberian pupuk N. Hasil penelitian tersebut diharapkan dapat digunakan sebagai bahan acuan penunjang bagi penelitian berikutnya

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Tanaman Tebu

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum L.*) termasuk keluarga rumput-rumputan yang tergolong tanaman C_4 . Pertumbuhan dan produktivitas tanaman tebu ditentukan oleh faktor dalam (genetik) dan faktor lingkungan baik abiotik maupun biotik. Faktor abiotik meliputi curah hujan, suhu udara dan sinar matahari. Sedangkan biotik meliputi berbagai mikroba yang bermanfaat maupun penyebab penyakit serta gulma yang mempengaruhi kehidupan tanaman. Faktor dalam (genetik) meliputi varietas yang berpotensi tinggi dan berusaha menciptakan lingkungan tumbuh yang baik sehingga tanaman tumbuh optimal dan produktivitas meningkat. Varietas unggul akan memberikan hasil yang lebih tinggi dibandingkan varietas standar pada standar budidaya yang diterapkan (Kuntohartono *et al.*, 1997).

Secara garis besar, varietas tebu dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu varietas tebu genjah, sedang dan dalam. Varietas tebu sedang dan dalam termasuk kategori varietas tebu non genjah (Supriyadi, 1992). Sukarso *et al.*, (1992) mendefinisikan tebu genjah adalah tebu yang pada umur 6-7 bulan telah mempunyai kandungan gula total (glukosa, fruktosa dan sukrosa) cukup tinggi, sehingga pada umur tersebut sudah dapat dipanen untuk diambil gulanya.

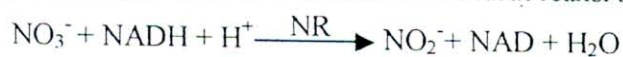
Menurut penelitian Marjayanti dan Arsana, (2000), pertumbuhan tebu genjah terutama tinggi tanaman tidak berbeda nyata dengan tebu non genjah. Pertumbuhan varietas tebu genjah pada umur 6 bulan telah mendekati maksimal terutama tinggi batangnya, karena telah memasuki fase kemasakan. Pada fase kemasakan, pertumbuhan vegetatif tebu menurun sedangkan pertumbuhan varietas tebu non genjah masih berlanjut hingga saat tebang, sehingga terjadi penambahan tinggi batang dan pada saat tebang potensi hasil tebunya relatif lebih tinggi dibanding tebu genjah.



2.2 Asimilasi Nitrogen serta Peranan Enzim Nitrat Reduktase (NR) dan Glutamin Sintetase (GS)

Pada tanaman, kandungan nitrogen (N) mencapai 2-6 % total berat kering tanaman. Sebagian besar nitrogen berbentuk asam amino, protein, atau asam nukleat. Dalam bahan organik ini, nitrogen sebagian besar berada dalam bentuk tereduksi (Gardner *et al.*, 1985). Nitrogen diserap oleh tanaman dalam bentuk nitrat (NO_3^-) atau amonium (NH_4^+). Baik nitrat maupun amonium dalam tanaman disintesa menjadi asam amino dan lebih lanjut disintesa menjadi protein yang bertindak sebagai enzim pada metabolisme tanaman (Sugiharto *et al.*, 1990). Nitrat yang diserap oleh tanaman harus direduksi terlebih dahulu menjadi amonia (NH_3) agar dapat digunakan dalam metabolisme nitrogen (Guerrero *et al.*, 1981).

Menurut Anderson dan Beardall (1991), reduksi nitrat menjadi amonium terjadi dalam dua reaksi yang berbeda yang dikatalisis oleh enzim yang berlainan. Pertama, nitrat direduksi menjadi nitrit dengan dua elektron transport yang reaksinya dikatalisis oleh *nitrat reduktase* menurut reaksi sebagai berikut :



Selanjutnya nitrit direduksi menjadi amonium dengan bantuan *nitrit reduktase* (NiR) dimana reaksinya adalah sebagai berikut :



Beever dan Hageman (1969) menyatakan bahwa NR merupakan enzim yang berperan dalam proses asimilasi nitrat karena enzim ini merupakan enzim pembatas terhadap laju pengaturan asimilasi nitrat pada awal reaksinya. Dengan demikian NR berperan juga mengatur laju sintesis senyawa-senyawa N tanaman. Senyawa N yang diserap oleh tanaman mempunyai peranan penting terhadap aktivitas enzim ini. Aktivitas NR dalam sel tanaman diduga dipengaruhi oleh ketersediaan nitrat dalam jaringan tanaman.

Amonia (NH_3) sebagai produk akhir dari proses asimilasi nitrat kemudian akan diubah ke bentuk organik melalui jalur *glutamine synthetase - glutamate synthase*, yang akan mensintesa asam amino, protein atau asam nukleat yang nantinya sangat dibutuhkan bagi pertumbuhan tanaman. Pada tanaman C_4 , glutamin sintetase mempunyai peranan penting untuk mengasimilasi amonia

yang dihasilkan dari reduksi nitrat menjadi glutamin. Enzim ini mempunyai afinitas yang tinggi terhadap amonia ($K_m = 3-5 \text{ mM}$) dan terdapat pada semua jaringan tanaman (Lea, 1999). Pada beberapa tanaman pangan, 70-80 % senyawa N akan direduksi dan diasimilasikan menjadi glutamin dengan menggunakan energi sinar matahari (Anderson dan Beardall, 1991).

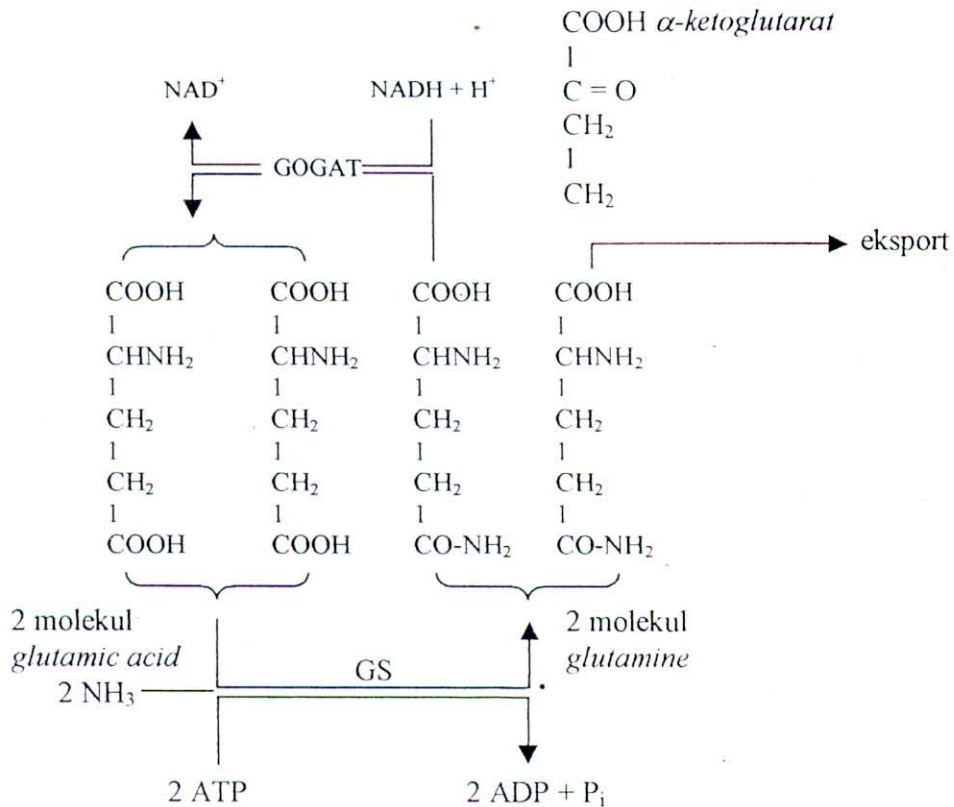
Asimilasi amonia terjadi dalam dua reaksi yang berbeda yang dikatalisis oleh enzim yang berlainan. Pertama, penambahan amonia ke dalam glutamat membentuk glutamin, dikatalisis oleh enzim *glutamin synthetase*:



Reaksi kedua, glutamin kemudian dikonversi kembali menjadi bentuk glutamat, dikatalisis oleh enzim *glutamin oxoglutarat aminotransferase*:



Asimilasi amonia melalui *glutamate synthase cycle*, secara jelas dapat dilihat pada Gambar 1. Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa 2 molekul glutamin akan dihasilkan oleh pengikatan amonium ke dalam 2 molekul glutamat yang dikatalisis oleh enzim glutamin synthetase. Satu molekul glutamin yang dihasilkan dari reaksi tersebut kemudian akan dikirim ke seluruh bagian tanaman, sedangkan satu molekul lainnya mengalami reaksi transaminasi dengan α -ketoglutarat menghasilkan 2 molekul glutamat. Reaksi ini dikatalisis oleh *glutamat oxoglutarat aminotransferase* (Hopkins, 1995).



Gambar 1. Asimilasi amonia (NH_3) melalui *glutamate synthase cycle*

2.3 Hubungan Aktivitas Nitrat Reduktase dengan Pertumbuhan Tanaman

Enzim diketahui berperan sebagai pengatur laju metabolisme dengan demikian tingkat aktivitasnya dapat digunakan sebagai penduga kemampuan metabolisme (Croy dan Hageman, 1970).

Hasil penelitian pada beberapa jenis tanaman menunjukkan bahwa taraf aktivitas NR berbeda untuk tiap genotip. Penelitian mengenai hubungan aktivitas NR dengan potensi hasil dan pertumbuhan tanaman telah banyak dilakukan terutama pada tanaman padi-padian seperti jagung, gandum dan sorghum. Pada tanaman jagung terjadi korelasi positif yang sangat tinggi antara aktivitas enzim NR dengan biomassa. Aktivitas NR di jaringan juga meningkat dengan meningkatnya jumlah nitrat yang diberikan. Hubungan positif antara aktivitas NR dengan potensi hasil diduga terjadi bila nitrat cukup tersedia selama musim

pertumbuhannya (Somers *et al.*, 1985). Aktivitas NR diduga bersifat terinduksi oleh substratnya yaitu nitrat (Beever dan Hageman, 1969).

2.4 Peranan Unsur Nitrogen Dalam Tanaman

Nitrogen merupakan unsur hara utama bagi pertumbuhan tanaman, yang pada umumnya sangat diperlukan untuk pembentukan dan pertumbuhan bagian-bagian vegetatif tanaman seperti daun, batang, dan akar. Unsur nitrogen juga merupakan bahan penyusun asam amino, amida, basa nitrogen dan nukleoprotein (Lea, 1999). Hasil penelitian menunjukkan bahwa, setiap genotip tanaman mempunyai respon terhadap nitrogen yang berlainan, genotip dengan respon nitrogen tinggi berarti genotip yang dengan penambahan nitrogen dalam ukuran tertentu menghasilkan produksi yang tinggi (Shannon *et al.*, 1986).

Unsur nitrogen mempunyai peranan penting tidak saja sebagai pembentuk asam-asam amino dalam tanaman, tetapi juga sebagai regulator gen *phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPC), *nitrat reduktase* (NR) dan *nitrit reduktase* (Sugiharto *et al.*, 1992), *light harvesting complex protein* (LHCP) serta klorofil a/b, serta sangat dibutuhkan dan penting untuk pembesaran sel dan pertumbuhan tanaman (Gardner *et al.*, 1985). Sehingga dapat dikatakan bahwa aktivitas enzim-enzim diatas dipengaruhi oleh keberadaan unsur nitrogen.

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penanaman dilaksanakan di Rumah Kaca Fakultas Pertanian dan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember mulai bulan Maret 2002 sampai Juli 2002.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan tanam yang digunakan adalah bibit tebu genjah PSTG 87-22643 dan tebu non genjah M 442-51 koleksi dari P3GI (Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia) Pasuruan. Bahan tanaman berupa bibit semai dari bagal mata satu yang berumur 2 minggu. Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain: larutan buffer Tris-HCl, PVP, Kpi, KNO₃, NADH, 1% Sulfanilamide dalam 1.5 N HCl, 0.02% N-Naphthethylene di-chloride, Na Arsenal, Glutamin, NH₂OH, ADP, FeCl₂ dan TCA. Alat laboratorium antara lain: tabung reaksi, mikropipet, eppendorf, sentrifuge, inkubator, dan spektrofotometer.

3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial) dengan empat kali ulangan dan dua faktor yaitu variasi dosis pemupukan nitrogen dan klon tebu.

Faktor 1 : variasi dosis pemupukan N, antara lain:

N₀ : 0 kg N/ha (tanpa pupuk N)

N₁ : 50 kg N/ha (50% dosis N anjuran)

N₂ : 100 kg N/ha (100% dosis N anjuran)

N₃ : 150 kg N/ha (150% dosis N anjuran)

Faktor 2 : Klon tebu, antara lain:

V₁ : Klon tebu genjah PSTG 87-22643

V₂ : Klon tebu non genjah M 442-51

Metode penyajian data menggunakan tabel dan gambar tabulasi. Analisa yang digunakan yaitu uji Duncan taraf 5% dan 1%.



3. 4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pertumbuhan Tanaman

Tebu genjah PSTG 87-22643 dan non genjah M 442-51 ditumbuhkan ke dalam polybag yang telah berisi tanah. Setiap polybag hanya berisi satu bibit. Pupuk P dan K diberikan bersamaan dengan waktu penanaman dengan dosis sesuai anjuran yaitu 1 kuintal SP 36/ha dan 2 kuintal KCL/ha. Pupuk N diberikan ketika tanaman berumur 2 bulan dengan dosis sesuai perlakuan. Takaran pupuk per polybag didasarkan pada berat media tanah (Lampiran 3). Masing-masing varietas diberi perlakuan pupuk N dengan dosis yaitu N_0 : 0 kg N/ha (tanpa pupuk N), N_1 : 50 kg N/ha (50 % dosis N anjuran), setara dengan 0.38 g Urea/polybag, N_2 : 100 kg N/ha (100 % dosis N anjuran), setara dengan 0.775 g Urea/polybag, N_3 : 150 kg N/ha (150 % dosis N anjuran), setara dengan 1.165 g Urea/polybag. Pemeliharaan tanaman yang meliputi penyiraman dilakukan dengan jalan menyiram tanaman dengan menggunakan selang air, sedangkan pengendalian hama penyakit, seperti belalang, dilakukan dengan menggunakan Furadan sesuai anjuran pakai.

3.4.2 Persiapan Bahan

Daun yang dipilih untuk pengujian aktivitas enzim, total protein terlarut dan kandungan klorofil adalah daun k+1 yaitu daun pertama yang membuka sempurna. Pengambilan sampel bahan dilakukan pada siang hari dan ada cahaya matahari (\pm 11.00 WIB). Daun dibelah memanjang dan tulang daun dibuang. Kemudian daun ditimbang secepatnya dan dimasukkan ke dalam nitrogen cair.

3.4.3 Ekstraksi Enzim

Sebanyak 2-3 gram daun digerus menggunakan mortal stumper pada temperatur 4° C. Untuk mempermudah hancurnya jaringan tanaman tebu, sewaktu ekstraksi ditambahkan N_2 cair. Setelah halus ditambahkan 3 kali volume buffer yang sesuai yaitu terdiri dari 100 mM Tris-HCL (pH 7.5) yang mengandung 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.5 mM PMSF dan ditambahkan 10 % PVP. Ekstraktan disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada

suhu 4°C. Ekstrak kasar kemudian disaring dengan menggunakan kolom kromatografi Sephadex G-25. Eluate yang didapat digunakan untuk analisa enzim. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan sebelum pemupukan yaitu pada saat tanaman berumur 2 bulan atau 0 hari, 3, 6 dan 9 hari setelah pemupukan N.

3.4.4 Pengukuran Aktivitas Enzim Nitrat Reduktase

Larutan penguji (*reaction mixture*) enzim NR adalah 25 mM Kpi (pH 7.5), 10 mM KNO₃, dan 5 mM NADH dan H₂O. Sebanyak 300 µL eluate ditambahkan ke dalam larutan penguji. Kemudian dengan cepat diinkubasikan pada suhu 30°C selama 0, 10 dan 20 menit. Penghentian aktivitas enzim dilakukan dengan menambahkan 1 ml 1 % Sulfanilamide dalam 1.5 N HCl dan 1 ml 0.02 % N-Napthethylinediamin di-Chlorida. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur intensitas cahaya yang terbentuk dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Besarnya aktivitas NR dihitung dengan membandingkan standart nitrit 20 nmol NO₂.

3.4.5 Pengukuran Aktivitas Enzim Glutamin Synthetase

Larutan penguji (*reaction mixture*) enzim GS adalah 100mL Tris-HCL, 20 mM Na-Arsenal, 0.7 mM Glutamin, 100 µL NH₂OH, 10 µL ADP, 580 µL H₂O. Sebanyak 200 µL eluate ditambahkan ke dalam larutan penguji. Kemudian dengan cepat diinkubasikan selama 0, 20 dan 40 menit. Sebanyak 1 ml larutan FeCl₂ dan TCA ditambahkan untuk menghentikan aktivitas enzim, kemudian disentrifuge selama 3 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm.

3.4.6 Penentuan Kandungan Total Protein Terlarut

Metode yang digunakan untuk menentukan total protein terlarut adalah metode Bradford *et al.*, (1976). Kandungan total protein terlarut diukur dengan cara memasukkan 5 µL sampel dalam 1 ml larutan Bradford. Kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan standart BSA 1 mg/ml.

3.4.7 Penentuan Kandungan Klorofil

Metode yang digunakan untuk menentukan kandungan klorofil adalah metode Wintermans dan Demonts (1965). Kandungan klorofil diukur dengan cara memasukkan ekstrak daun sebanyak 0.114 ml ke dalam 2.886 ml ethanol 99.8 %. Sentrifuge selama 5 menit. Supernatan diambil dan diukur pada panjang gelombang 649 nm dan 665 nm. Kandungan klorofil (a + b) ditentukan dengan rumus :

$$\text{Chl (a + b)} = (6,10 \cdot \text{Abs}_{665}) + (20,04 \cdot \text{Abs}_{649}) \mu\text{g/ml}$$

3.4.8 Penentuan Biomassa dan Tinggi Tanaman

Penentuan biomassa dan tinggi tanaman dilakukan pada saat tanaman berumur 2.5 bulan. Berat biomassa (gram) ditentukan dengan mengeringkan bagian atas tanaman pada temperatur 80°C selama 48 jam, kemudian ditimbang. Sedangkan tinggi tanaman (cm) ditentukan dengan cara mengukur mulai pangkal batang sampai ujung tertinggi.

3.5 Parameter

Parameter utama yang diamati yaitu aktivitas nitrat reduktase dan aktivitas glutamin sintetase, sedangkan parameter tambahan yang diamati yaitu kandungan total protein terlarut (TPT), kandungan klorofil, biomassa dan tinggi tanaman.

V. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Peningkatan dosis pupuk nitrogen yang diberikan akan meningkatkan aktivitas enzim NR dan GS, TPT, dan kandungan klorofil, bioinassa dan tinggi tanaman pada kedua klon tebu. Pada semua parameter di atas tebu non genjah mempunyai nilai lebih tinggi, kecuali parameter kandungan klorofil. Hal ini menunjukkan klon tebu non genjah lebih respon terhadap pemupukan nitrogen dibanding klon tebu genjah.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan tentang mekanisme regulasi ekspresi gen NR dan GS pada klon tebu genjah dan non genjah.



DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J. W. and J. Beardall. 1991. *Molecular Activities of Plant Cell, An Introduction of Plant Biochemistry*. Oxford : Blackwell Sci. Publ.
- Anonim, 1992. *Pembudidayaan Tebu di Lahan Sawah dan Tegalan*. Jakarta : Penebar Swadaya. 112.
- Beever, L. and R.H. Hageman. 1969. "Nitrate Reduction in Higher Plant". *J. Plant Physiol.* 20: 495 – 522.
- Bradford, M.M. 1976. "A.Rapid and Sensitive Methode for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding". *J. Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Croy, L.I. and R.H. Hageman. 1970. "Relationship of Nitrate Reductase Activity to Grain Protein Production in Wheat. *J. Crop Science.* 10: 280 – 285.
- Foyer, C.H., M.H. Valadier, A. Migge and T.W. Becker. 1998. "Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mrna and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves". *J. Plant Physiol.* 117: 283 – 292.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce and R.L. Mitchell. 1985. *Physiology of Crop Plants*. Netherland : The Iowa State University Press.
- Guerrero, M.G., J.M. Vega and M. Losada. 1981. "The Assimilatory Nitrate Reducing System and its Regulation". *J. Plant Physiol.* 32: 169 – 204.
- Hopkins, W.G. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. New York : John Wiley and Sons, Inc. 115.
- Huber, S.C., J.L. Huber. W. Campbell and M.G. Radinbaugh. 1994. "Regulation of Maize leaf Nitrate Reductase Activity Involves Both Gene Expression and Protein Phosphorylation". *J. Plant Physiol.* 106: 1667 – 1674.
- Kuntohartono, T., W.D. Arsana dan Lilik. 1997. *Penanaman Varietas Unggul Tebu sebagai Efisiensi Budidaya Tebu*. Gula Indonesia. 22: 20 – 22.

- Lea, P.J. and R.C. Leegod. 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. New York : John Wiley and Sons. 163.
- Marjayanti dan W.D. Arsana. 2000. *Tebu Genjah sebagai Alternatif Pasok Tebu Awal Giling yang Efisien*. Berita P3GI. 5: 5 – 10.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology*. Fourth Edition. California. Wadsworth Publishing company.
- Sugiharto B., Miyata K., Nakamoto H., Sasahama H. and Sugiyama T. 1990. "Regulation of Expression of Carbon Assimilating Enzyme by Nitrogen in Maize leaf. *J. Plant Physiol.* 92: 963-969.
- Sugiharto, B. and T. Sugiyama. 1992. " Effects of Nitrate and Ammonium on Gen Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Nitrogen Metabolism in Maize Leaf Tissue During Recovery from Nitrogen stress". *J. Plant Physiol.* 1403-1408.
- Sukarso, G., T. Harisutji dan G. Soepardi. 1992. *Kadar Gula Total Varietas Tebu Umur 6-7 bulan Seri PS 87*. Berita P3GI. 1: 1 – 2.
- Supriyadi, A. 1992. *Rendemen Tebu : Liku-liku Permasalahannya*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius.
- Shannon, J.C., D.P. Knievel and C.D. Boyer. 1986. "Regulation of Carbon and Nitrogen Reduction and Utilization in Maize". *J. Plant Physiol.* 72: 949 – 952.
- Wintermons, J. F. G. M. and Demonts. 1965. " Spectrophotometric Characteristic of Chlorophylls a and b and Their Phephytin in Ethanol". *J. Biochem. Biophys.* 24: 448-453.

Lampiran 1. Perhitungan Dosis Pupuk per Hektar

1. Kandungan hara N, P, K berdasar analisis tanah adalah :

- N : 0,12 %
- P_2O_5 : 75 ppm
- K_2O : 156 ppm

2. Perhitungan kebutuhan pupuk

a. Menentukan dosis pupuk N

N tanah sebesar 0.12 % tergolong sedang, kesesuaian dengan anak panah nomograf menunjukkan angka 100 berarti tanah tersebut perlu dipupuk 100 kg N/ha atau bila dengan pupuk Urea (46 %N) sebesar :

$$100/46 \cdot 100 \text{ kg Urea} = 217.39 \text{ kg Urea/ha}$$

b. Menentukan dosis pupuk P

P tanah sebesar 75 ppm tergolong tinggi sekali, berdasarkan nomograf seharusnya tidak ditambah pupuk P. Namun untuk tindakan preventif ditambahkan 1 ku TSP/ha.

c. Menentukan dosis pupuk K

K tanah sebesar 156 ppm tergolong sedang, anak panah nomograf menunjuk angka 117.5 berarti tanah tersebut perlu dipupuk 117.5 kg K_2O /ha atau dengan pupuk KCL (60% K_2O) sebesar :

$$117.5/60 \cdot 100 \text{ kg KCL} = 195.8 \text{ KCL/ha, pembulatan menjadi 2 ku KCL/ha}$$

Lampiran 2. Tata Letak Percobaan

Macam Perlakuan

Klon V_1 : PSTG 87-22643

V_2 : M 442-51

Nitrogen N_0 : 0 (tanpa pupuk N)

N_1 : 50 kg N/ha setara dengan 108.69 kg Urea/ha

N_2 : 100 kg N/ha setara dengan 217.39 kg Urea/ha

N_3 : 150 kg N/ha setara dengan 326.1 kg Urea/ha

Pupuk P = 1 ku TSP/ha, sedangkan pupuk K = 2 ku KCL/ha

Kombinasi perlakuan

V_1N_0 V_2N_0

V_1N_1 V_2N_1

V_1N_2 V_2N_2

V_1N_3 V_2N_3

Ulangan : 4 (empat) kali

Rancangan : RAL Faktorial

V_1N_1	V_1N_2	V_2N_0	V_1N_0
V_2N_3	V_2N_3	V_1N_3	V_1N_3
V_1N_0	V_2N_2	V_1N_0	V_2N_0
V_2N_1	V_1N_1	V_2N_2	V_2N_3
V_2N_2	V_1N_0	V_2N_3	V_2N_1
V_2N_0	V_2N_1	V_1N_2	V_2N_2
V_1N_2	V_1N_3	V_2N_1	V_2N_1
V_1N_3	V_2N_0	V_1N_1	V_2N_2

Lampiran 3. Perhitungan kebutuhan pupuk per polybag

Berat tanah tiap polybag adalah 7.5 kg

$$Bv \text{ tanah} = 1.05 \text{ g/cm}^3$$

Berat tanah/ha kedalaman 20 cm :

$$= 1.05 \text{ g/cm}^3 \times 20 \text{ cm} \times 10000 \text{ cm} \times 10000 \text{ cm}$$

$$= 1.05 \text{ g/cm}^3 \times 2.10^9 \text{ cm}^3$$

$$= 2.1. 10^9 \text{ gram}$$

$$= 2.1. 10^6 \text{ kg}$$

1. Kebutuhan pupuk N per polybag

$$\text{Perlakuan } N_1 = 108.69 \text{ kg Urea/ha}$$

$$= 7.5 \text{ kg} / 2.1. 10^6 \text{ kg} \times 108.69 \text{ kg Urea}$$

$$= 0.38 \text{ gram Urea}$$

$$\text{Perlakuan } N_2 = 217.39 \text{ kg Urea/ha}$$

$$= 7.5 \text{ kg} / 2.1. 10^6 \text{ kg} \times 217.39 \text{ kg Urea}$$

$$= 0.775 \text{ gram Urea}$$

$$\text{Perlakuan } N_3 = 326.1 \text{ kg Urea/ha}$$

$$= 7.5 \text{ kg} / 2.1. 10^6 \text{ kg} \times 326.1 \text{ kg Urea}$$

$$= 1.165 \text{ gram Urea}$$

2. Kebutuhan pupuk TSP per polybag

$$= 7.5 \text{ kg} / 2.1. 10^6 \times 100 \text{ kg TSP}$$

$$= 0.0003571 \text{ kg} = 0.3571 \text{ gram TSP}$$

3. Kebutuhan pupuk KCL per polybag

$$= 7.5 \text{ kg} / 2.1. 10^6 \times 200 \text{ kg KCL}$$

$$= 0.0007142 \text{ kg} = 0.7142 \text{ gram KCL}$$

Lampiran 4. Rata-rata Biomassa Tanaman (Gram)

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
	I	II	III	IV		
V ₁ N ₀	62.55	62.22	56.01	59.24	240.02	60.0050
V ₁ N ₁	90.37	90.28	90.11	113.04	383.80	95.9500
V ₁ N ₂	134.23	102.52	98.44	120.80	455.99	113.9975
V ₁ N ₃	143.39	143.85	72.29	150.78	510.31	127.5775
V ₂ N ₀	58.56	61.07	54.69	46.95	221.27	55.3175
V ₂ N ₁	118.58	79.05	128.81	120.91	447.35	111.8375
V ₂ N ₂	122.91	131.64	129.59	135.29	519.43	129.8575
V ₂ N ₃	112.81	128.19	120.03	134.66	495.69	123.9225
Total					3273.86	
Rata-rata						102.3081

Tabel Jumlah V dan N

Faktor	V ₁	V ₂	Total	Rata-rata
N ₀	240.02	221.27	461.29	57.66125
N ₁	383.60	447.35	831.15	103.89380
N ₂	455.99	519.43	975.42	121.92750
N ₃	510.31	495.69	1006.00	125.75000
Total	1590.12	1683.74		
Rata-rata	99.3825	105.2338		

Lampiran 5. Rata-rata Tinggi Tanaman (cm)

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
	I	II	III	IV		
V ₁ N ₀	61	71	68	81	281.00	70.250
V ₁ N ₁	104	99	91	108.5	402.50	100.625
V ₁ N ₂	112	97	109	119	437.00	109.250
V ₁ N ₃	80	112	99	101.5	392.50	98.125
V ₂ N ₀	87	80	85	75	327.00	81.750
V ₂ N ₁	127	117	95.2	112	451.20	112.800
V ₂ N ₂	129	121	138	111.5	499.50	124.875
V ₂ N ₃	122	122.5	116	111	471.50	117.875
Total					3262.20	
Rata-rata						101.9438

Tabel Jumlah V dan N

Faktor	V ₁	V ₂	Total	Rata-rata
N ₀	281	327	608	76
N ₁	402.5	451.2	853.7	106.7125
N ₂	437	499.5	936.5	117.0625
N ₃	392.5	471.5	864	108
Total	1513	1749.2		
Rata-rata	94.5625	109.325		

