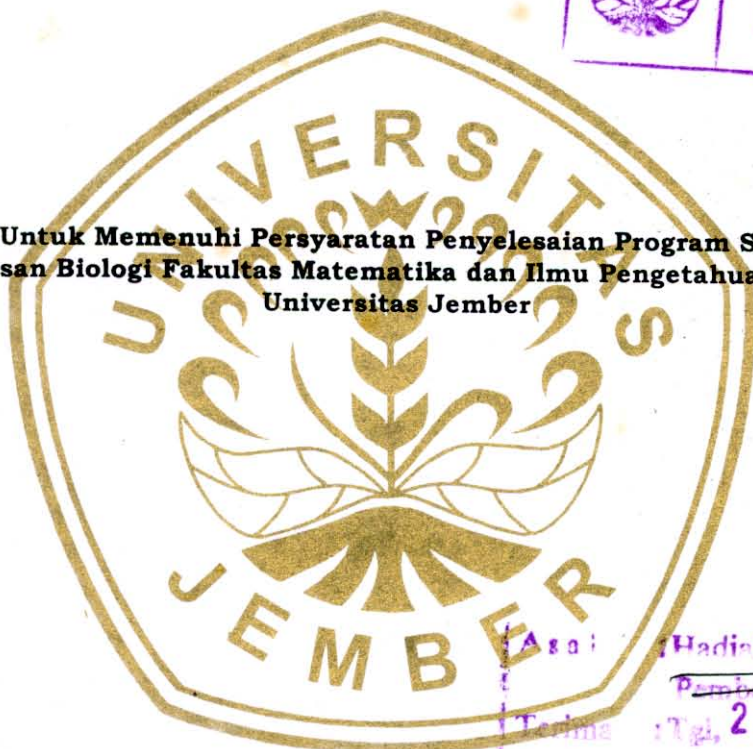


**AKTIVITAS *PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE* DAN
KANDUNGAN *RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/
OXYGENASE* PADA KLON TEBU GENJAH DAN NON GENJAH
SERTA RESPONNYA TERHADAP
PEMUPUKAN NITROGEN**

SKRIPSI



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



Asal : Hadiah
Pembelian
Tgl. 25 Feb 2003
No. Induk
Klass
581.1
SUC
a
e.1

Oleh :

Mukhamad Su'udi
NIM. 981810401024

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

DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil penelitian mulai bulan Maret 2002 sampai dengan bulan Juli 2002 di Pusat Penelitian Biologi Molekul 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.

Jember, Januari 2003



Mukhamad Su'udi

ABSTRAK

Aktivitas *phosphoenolpyruvate carboxylase* dan Kandungan *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* pada Klon Tebu Genjah dan Non Genjah serta Responnya Terhadap Pemupukan Nitrogen, Mukhamad Su'udi, 981810401024, Skripsi, Januari 2003, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Aktivitas *phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPC) dan kandungan *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (Rubisco), sebagai enzim utama dalam fotosintesis, diukur dan dibandingkan pada dua klon tebu yang memiliki tingkat akumulasi sukrosa berbeda. Klon-klon tebu yang dimaksud adalah klon tebu genjah PS 87-22643 yang memiliki tingkat akumulasi sukrosa lebih cepat dibanding klon tebu non genjah M 442-51. Perlakuan beberapa dosis pupuk N diberikan untuk mengetahui ekspresi enzim PEPC dan Rubisco pada kedua klon tebu. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi mengenai aktivitas PEPC dan kandungan Rubisco 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 PEPC dan kandungan Rubisco klon tebu non genjah lebih tinggi dibanding tebu genjah. Aktivitas PEPC rata-rata klon tebu genjah dan tebu non genjah berturut-turut adalah 5,07 unit/gfw dan 6,23 unit/gfw. Aktivitas PEPC kedua klon tebu dipengaruhi ketersediaan unsur N dalam tanah, sedangkan kandungan Rubisco tidak terpengaruh dengan penambahan unsur N dalam tanah. Aktivitas PEPC tertinggi pada klon tebu genjah terjadi pada hari ke-6 setelah pemupukan yaitu sebesar 8,42 unit/gfw pada dosis 100 kg N/ha, sedangkan pada klon tebu non genjah mencapai 9,16 unit/gfw pada dosis pupuk N 50, 100 dan 150 kg N/ha. Aktivitas PEPC berkorelasi nyata dengan biomassa pada klon tebu non genjah dengan nilai $r = 0,95$, tetapi korelasinya tidak nyata pada tebu genjah dengan nilai $r = 0,66$. Kandungan sukrosa yang tinggi pada klon tebu genjah tidak dicerminkan pada aktivitas enzim fotosintesis.

Kata kunci : phosphoenolpyruvate carboxylase, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, tebu, genjah, non genjah, pupuk N.

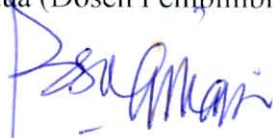
HALAMAN PENGESAHAN

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

Hari : Selasa
Tanggal : 25 FEB 2003
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

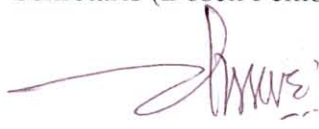
Tim Penguji

Ketua (Dosen Pembimbing Utama)




(B. Sugiharto, D.Agr., M.Agr., Ir.)
NIP. 131 131 021

Sekretaris (Dosen Pembimbing Anggota)




(Dra. Dwi Setyati, M.Si.)
NIP. 131 945 801

Anggota I



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


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 *phosphoenolpyruvate carboxylase* dan Kandungan *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* 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 Dra. Dwi Setyati, M.Si., 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 kerja samanya 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, Januari 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
DEKLARASI	ii
ABSTRAK	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN	xi
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan dan Manfaat.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tanaman Tebu.....	4
2.2 Fisiologi Enzim Fotosintesis.....	5
2.3 Unsur Nitrogen.....	7
III. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Bahan Tanam dan Pertumbuhan Tanaman.....	9
3.2 Ekstraksi Enzim.....	10
3.3 Pengukuran Aktivitas Enzim PEPC.....	10
3.4 Analisa Western Blotting.....	10
3.5 Penentuan Kandungan Protein dan Klorofil.....	10
3.6 Penentuan Biomassa dan Tinggi Tanaman.....	11

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .

4.1 Respon Aktivitas PEPC Terhadap Pemupukan Nitrogen.....	12
4.2 Respon Kandungan Rubisco Terhadap Pemupukan Nitrogen..	14
4.3 Kandungan Protein dan Klorofil	15
4.4 Pengamatan Pertumbuhan	17

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	20
5.2 Saran.....	20

DAFTAR PUSTAKA	21
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN	23
-----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

No.	Halaman
1. Kandungan total protein terlarut pada klon tebu genjah dan non genjah	16
2. Kandungan klorofil pada klon tebu genjah dan non genjah.....	17
3. Pengaruh dosis pemupukan nitrogen terhadap biomassa dan tinggi tanaman pada klon tebu genjah dan non genjah.....	18

DAFTAR GAMBAR

No.	Halaman
1. Proses asimilasi karbon pada tanaman C ₄	6
2. Peningkatan aktivitas PEPC klon tebu genjah dan non genjah akibat pemupukan nitrogen	13
3. Kandungan Rubisco klon tebu genjah dan non genjah	15
4. Hubungan antara perubahan aktivitas PEPC dengan perubahan biomassa tanaman pada klon tebu genjah dan non genjah	19

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1. Perhitungan Dosis Pupuk per Hektar	23
2. Tata Letak Percobaan	24
3. Perhitungan Kebutuhan Pupuk per Polybag	25
4. Tabel Data Biomassa Tanaman	26
5. Tabel Analisis Sidik Ragam Biomassa Tanaman RAL 2 Faktor	26
6. Tabel Data Tinggi Tanaman	27
7. Tabel Analisis Sidik Ragam Tinggi Tanaman RAL 2 Faktor	27

DAFTAR SINGKATAN

BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolil phosphate
BSA	: Bovine serum albumine
BSC	: Bundle Sheat Cells
β -ME	: β -mercaptoethanol
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetid Acid
LSU	: Large sub unit
MC	: Mesophyl Cells
MDH	: Malic Dehydrogenase
NADH	: Nicotinamide Adenin Dinucleotide (tereduksi)
OAA	: Oxaloacetid Acid
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
PEP	: Phosphoenolpyruvate
PEPC	: Phosphoenolpyruvate carboxylase
PGA	: Phosphoglyceric Acid
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl Fluoride
RuBp	: Ribulose-1,5-bisphosphate
Rubisco	: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SDS-PAGE	: Sodium Dodecylsulfat Polyachrylamide Gel Electrophoresis
SPS	: Sucrose Phosphate Synthase
SSU	: Small sub unit
gfw	: gram <i>fresh weight</i> (berat segar)



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum L.*) merupakan tanaman penting sebagai penghasil gula utama di Indonesia (Hadiwigeno, 1991). Dari waktu ke waktu, kebutuhan konsumsi gula semakin meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk sehingga menuntut tersedianya bahan baku yang semakin banyak.

Salah satu upaya untuk memenuhi kebutuhan gula adalah dengan menanam tebu varietas unggul yang memiliki ciri genjah. Penggunaan varietas tebu dengan ciri genjah sangat menguntungkan karena produksi per satuan waktu dapat meningkat (Sukarso *et al.*, 1992). Penanaman tebu genjah diharapkan dapat mengatasi pasokan di awal giling yang rendah dan dapat memperbaiki rendemen. Tebu varietas genjah memiliki tingkat akumulasi sukrosa yang berbeda dengan varietas non genjah. Sukarso *et al.*, (1992) telah berhasil mendapatkan klon-klon tebu genjah yang pada umur 6-7 bulan telah memiliki kandungan gula total cukup tinggi sehingga dapat segera dipanen. Terdapat 4 klon tebu yang tergolong mempunyai potensi rendemen tinggi pada umur 7 bulan yaitu PS 87-22643, PS 87-2378, PS 87-22870 dan PS 87-22953 dengan kandungan gula total berturut-turut 20.56, 20.17, 19.40 dan 21.38 %. Sedangkan tebu non genjah M 442-51 dan F 154 pada saat panen (umur 12 bulan) memiliki kandungan gula total lebih rendah berturut-turut 15,49 dan 17,51 %. Kandungan sukrosa PS 87-22643 adalah 19,02 %, lebih tinggi jika dibandingkan dengan M 442-51 dan F 154 dengan kandungan sukrosa 12,90 dan 15,78 %.

Kandungan sukrosa pada batang tanaman tebu tidak terlepas dari proses biokimia yang terjadi dalam fotosintesis (Klein, 1987). Proses fotosintesis pada tanaman tebu menyerupai tanaman C_4 lainnya. Tanaman C_4 memiliki proses fotosintesis yang efisien karena adanya diferensiasi dari dua tipe sel yaitu sel mesofil (MC) dan *bundle sheat cells* (BSC) (Ueno, 2001). Dua enzim penting dalam proses fotosintesis pada tanaman C_4 adalah *phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPC) dan *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*

(Rubisco). Enzim PEPC berperan dalam memfiksasi CO₂ pada sel mesofil tanaman C₄, sedangkan enzim Rubisco berperan dalam mengkatalisis reaksi antara CO₂ dengan molekul *ribulose-1,5-bisphosphate* (RuBp) pada bundle sheat cells (Lakitan, 1995). Enzim PEPC dan Rubisco juga berperan dalam meningkatkan biomassa dan menentukan pertumbuhan tanaman C₄ (Sugiharto *et al.*, 1996). Mengingat peranan penting dari kedua enzim tersebut, maka pengamatan fisiologis mengenai aktivitas enzim PEPC dan Rubisco perlu dilakukan terhadap klon tebu yang berbeda varietas.

Keadaan fisiologis tanaman juga dipengaruhi kondisi lingkungan pertumbuhan, seperti kandungan unsur hara dalam tanah. Beberapa unsur hara mempunyai pengaruh terhadap kecepatan fotosintesis, misalnya unsur-unsur N, K dan Fe. Hal ini karena unsur-unsur tersebut mempunyai pengaruh terhadap kadar klorofil dalam tumbuhan (Heddy, 1990). Unsur nitrogen merupakan regulator penting dari ekspresi gen beberapa protein seperti *nitrate reduktase* (NR), *nitrite reduktase* (NiR), PEPC (Sugiharto *et al.*, 1992), *light harvesting complex protein* (LHCP) serta klorofil a/b (Gardner *et al.*, 1985). Karena enzim adalah protein dan merupakan produk dari ekspresi gen, maka bagaimana responnya terhadap pemupukan N pada tebu genjah dan non genjah perlu diketahui.

1.2 Rumusan Masalah

Tanaman tebu termasuk jenis tanaman C₄ yang mempunyai sifat efisiensi fotosintesis lebih tinggi dibanding tanaman C₃. Tingkat fotosintesis pada tanaman C₄ ditentukan oleh keberadaan enzim PEPC dan Rubisco. Klon tebu genjah dan non genjah menunjukkan karakter yang berbeda terhadap kandungan sukrosa yang merupakan hasil akhir dalam proses fotosintesis. Hal ini mendorong peneliti untuk melakukan penelitian terhadap aktivitas enzim fotosintesis (PEPC dan Rubisco) pada klon tebu genjah dan non genjah. Unsur N berpengaruh terhadap ekspresi gen fotosintesis dan enzim adalah protein, maka keberadaan unsur N di lingkungan akan mempengaruhi aktivitas enzim maupun kandungan protein dalam tanaman. Oleh karena itu, penelitian mengenai respon pemupukan N

terhadap klon tebu genjah dan non genjah perlu dilakukan. Dari uraian tersebut di atas, akan memunculkan suatu permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana perbedaan karakter pada klon tebu genjah dan non genjah utamanya aktivitas fotosintesis (PEPC dan Rubisco)?
2. Bagaimana respon aktivitas enzim PEPC dan kandungan Rubisco pada kedua klon tebu tersebut terhadap pemupukan unsur N ?

1.3 Tujuan dan Manfaat

Dari penelitian ini diharapkan akan diperoleh informasi mengenai perbandingan aktivitas fotosintesis utamanya enzim PEPC dan kandungan enzim Rubisco 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.



2.1 Tanaman Tebu

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman perkebunan semusim, yang mempunyai karakteristik tersendiri karena terdapat zat gula dalam batangnya. Tebu termasuk keluarga rumput-rumputan (*gramineae*) seperti halnya padi, glagah, jagung, bambu dan lain-lain (Supriyadi, 1992). Panjang batang tanaman tebu mampu mencapai tinggi sekitar 8 meter dengan diameter batang 10 cm (Klein, 1987).

Varietas tebu sangat banyak jumlahnya, tetapi tidak semuanya unggul. Varietas yang berjumlah banyak tersebut dapat dibagi berdasarkan produktivitasnya, kecepatan kemasakan dan lahan penanaman (Indriani dan Sumiarsih, 1992). Berdasarkan kecepatan kemasakannya, tebu dapat dibedakan menjadi tiga yaitu varietas genjah, varietas sedang dan varietas dalam. Varietas sedang dan varietas dalam termasuk kategori varietas tebu non genjah. Ada pula yang menyebut tebu jenis masak awal, masak tengahan dan masak akhir (Supriyadi, 1992). Ciri genjah sangat menguntungkan karena produksi per satuan waktu dapat meningkat. Lebih dari itu pemindahan tebu ke lahan tadah hujan dan kering memaksa tanaman untuk dapat lebih menyesuaikan dengan kondisi iklim. Iklim dengan masa pertumbuhan pendek, iklim bimodal, akses curah hujan, prevalen hama dan penyakit dan diversifikasi produk merupakan faktor pendorong pemanfaatan tebu genjah (Sukarso *et al.*, 1992).

Varietas tebu PS 87 merupakan varietas tebu genjah yang mempunyai kadar gula total dan rendemen yang cukup tinggi. Tebu dengan varietas tersebut dapat ditebang pada umur 6-7 bulan dan telah memiliki kandungan gula total cukup tinggi sehingga dapat dipanen (Sukarso *et al.*, 1992). Terdapat 4 klon yang tergolong dalam seri PS 87 yaitu PS 87-22643, PS 87-2378, PS 87-22870 dan PS 87-22953 dengan kandungan gula total berturut-turut 20.56, 20.17, 19.40 dan 21.38 %. Sedangkan contoh klon tebu non genjah adalah F 154 dan M 442-51 dengan kandungan gula total berturut-turut 17,51 dan 15,49 %. Kandungan sukrosa F 154 pada umur 6 bulan berkisar 8,97 % sedangkan kandungan sukrosa

PS 87-22643 pada umur yang sama dapat mencapai 16,12 %. Dibandingkan dengan varietas non genjah F 154, potensi varietas tebu PS 87-22643, PS 87-22953 dan PS 87-22870 masing-masing lebih tinggi 3.55 poin, 3.16 poin dan 2.24 poin (Marjayanti dan Arsana, 2000).

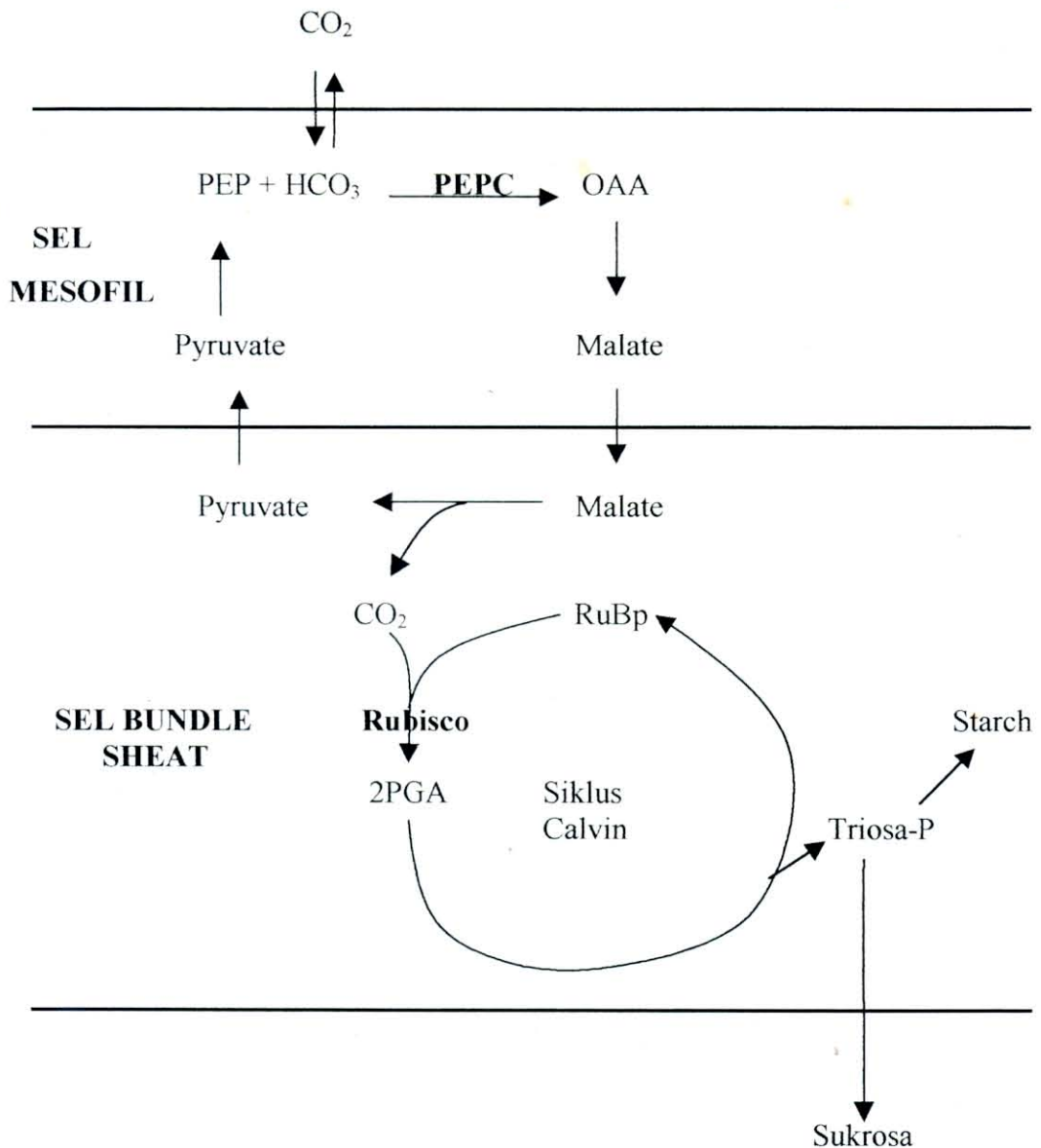
2.2 Fisiologi Enzim Fotosintesis

Tanaman tebu adalah jenis tanaman C_4 . Tanaman C_4 memiliki proses fotosintesis (asimilasi karbon) yang efisien karena adanya diferensiasi dari dua tipe sel yaitu sel mesofil (MC) dan *bundle sheat cells* (BSC) (Ueno, 2001). Pada kondisi tekanan temperatur tropis (30° sampai 40° C), laju fotosintesis dari tanaman C_4 bisa dua sampai tiga kali lebih besar dari pada tanaman C_3 (Hopkins, 1995). Proses fotosintesis yang efisien tersebut juga dipengaruhi oleh adanya dua enzim penting fotosintesis tanaman C_4 yaitu *phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPC) dan *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (Rubisco) (Gardner *et al.*, 1985). PEPC berperan dalam memompakan CO_2 ke bundle sheat cells sehingga terjerenuhi oleh CO_2 yang selanjutnya ditangkap oleh Rubisco.

Siklus asimilasi karbon pada tanaman C_4 terdiri dari empat tahap : 1) asimilasi CO_2 , termasuk proses karboksilasi *phosphoenolpyruvate* dalam sel-sel mesofil membentuk asam C_4 (malat atau aspartat), 2) transport asam C_4 menuju bundle sheat cells, 3) dekarboksilasi asam C_4 dalam bundle sheat cells dan re-asimilasi CO_2 oleh Rubisco melalui siklus *Calvin* dan 4) regenerasi C_3 yang terbentuk melalui dekarboksilasi kembali menuju sel mesofil dan pelepasan *phosphoenolpyruvate* sebagai aseptor CO_2 (Taiz dan Zeiger, 1991).

Enzim kunci pada asimilasi karbon tanaman C_4 adalah enzim *phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPC). Enzim PEPC menggunakan ion bikarbonat (HCO_3^-) sebagai substratnya. Produk reaksi yang dikatalisis oleh PEPC adalah asam oksaloasetat (OAA), yang berada dalam bentuk kurang stabil dan secara cepat direduksi menjadi asam C_4 (malat atau aspartat) yang lebih stabil yang kemudian ditransport ke luar sel mesofil menuju bundle sheat cells di dekatnya. Di dalam bundle sheat cells, asam C_4 mengalami dekarboksilasi dan

menghasilkan CO_2 yang bisa digunakan untuk reduksi gula triosa melalui siklus Calvin (Hopkins, 1995).



Gambar 1. Proses Asimilasi Karbon pada Tanaman C_4 . (Taiz dan Zeiger, 1991; dan Hopkins, 1995)

Tebu termasuk jenis tanaman C_4 yang bertipe *NADP - malic enzyme* (*NADP-ME*) dimana asam oksaloasetat pertama kali dikonversi menjadi asam malat yang kemudian ditransport menuju bundle sheath cells sehingga terjadi dekarboksilasi menghasilkan asam piruvat (asam C_3) dan CO_2 . Asam piruvat selanjutnya ditransport kembali menuju sel mesofil dan mengalami fosforilasi

menjadi PEP. Reaksi fosforilasi dikatalisis oleh enzim piruvat, *phosphate dikinase* yang membutuhkan 2 ATP sebagai sumber energi (Hopkins, 1995).

Taiz dan Zeiger (1991) menyatakan bahwa CO_2 yang masuk siklus Calvin selanjutnya bereaksi dengan *ribulose-1,5-bisphosphate* untuk menghasilkan 2 molekul *3-phosphoglycerate* (PGA). Reaksi ini dikatalisis oleh enzim *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, yang lebih dikenal dengan nama singkat Rubisco. Senyawa PGA kemudian dikonversi menjadi *3-phosphoglyceraldehyde* (3-PGal) dan akhirnya terbentuk triosa dan diekspor ke sitosol (Salisbury dan Ross, 1992). Rubisco berjumlah kurang lebih 40 % dari total protein terlarut dalam daun. Konsentrasi sisi aktif Rubisco dalam kloroplas berkisar 4 mM, atau 500 kali lebih besar dari konsentrasi CO_2 (Taiz dan Zeiger, 1991).

Rubisco memiliki dua fungsi katalisis (bifungsional). Selain mengkatalisis penambahan karbondioksida (CO_2) untuk bereaksi dengan RuBp membentuk satu molekul *3-phosphoglycerate*, Rubisco juga mengkatalisis penambahan oksigen (O_2) untuk bereaksi dengan RuBp membentuk satu molekul *3-phosphoglycerate* dan *glycollate 2-phosphate*. Karbondioksida bertindak sebagai penghambat kompetitif dari reaksi oksigenasi dan oksigen sebagai penghambat kompetitif pada reaksi karboksilasi.

Tidak seperti reaksi karboksilasi lainnya, mekanisme dari Rubisco berdasar mekanisme *ene-diol*, yang terdiri dari lima tahap yang terpisah yaitu: 1) deprotonasi dari 3 karbon (enolisasi) menjadi *2,3-enediol*, 2) karboksilasi membentuk 6-karbon *β -ketoacid intermediate*, *3-keto-2-carboxyarabinitol bisphosphate*, 3) hidrasi menjadi bentuk *gem-diol*, 4) deprotonasi, menghasilkan *C-C cleavage* dan 5) protonasi untuk menghasilkan molekul kedua dari *glycerate 3-phosphate* (Lea dan Leegod, 1996).

2.3 Unsur Nitrogen

Nitrogen adalah unsur yang paling banyak mendapat perhatian dibanding dengan unsur hara lainnya. Jumlah nitrogen di dalam tanah sedikit, sedang yang diangkut tanaman tiap musim sangat banyak. Tanaman menyerap unsur hara

nitrogen dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ yang digunakan untuk membentuk asam amino protein serta jaringan tanaman (Hakim, 1986).

Seperti pada tanaman lainnya, sebagian besar senyawa organik pada tanaman tebu mengandung nitrogen seperti asam amino, asam nukleat, enzim-enzim, adenosin difosfat (ADP) dan adenosin trifosfat (ATP). Unsur nitrogen merupakan regulator penting dari ekspresi gen beberapa protein pada tanaman tingkat tinggi dan alga melalui mekanisme transkripsi dan stabilitas mRNA. Protein yang dimaksud meliputi *nitrate reduktase* (NR), *nitrite reduktase* (NiR), PEPC, *light harvesting complex protein* (LHCP), protein vegetatif dan klorofil a/b (Sugiharto *et al.*, 1992). Pemberian unsur N akan meningkatkan kandungan klorofil dalam daun, ekspresi PEPC dan tingkat asimilasi karbon. Meningkatnya senyawa karbon yang dapat diasimilasi akan berpengaruh dalam meningkatkan proses fotosintesis yang pada akhirnya berpengaruh terhadap pertumbuhan dan biomassa tanaman. Suatu tanaman tidak dapat meneruskan proses kehidupannya jika tidak memiliki nitrogen yang cukup untuk membuat persenyawaan ini. Tanaman yang tumbuh membutuhkan nitrogen untuk membentuk sel-sel baru. Fotosintesis dapat memproduksi karbohidrat dari CO_2 dan H_2O , tetapi tidak dapat memproduksi protein, asam nukleat dan sebagainya apabila tidak cukup tersedia nitrogen. Jadi kekurangan nitrogen akan dapat menghentikan proses pertumbuhan dan produksi tanaman (Hakim, 1986).

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan Tanam dan Pertumbuhan Tanaman

Bahan tanam yang digunakan adalah bibit tebu genjah PS 87-22643 dan tebu non genjah M 442-51 koleksi dari P3GI (Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia) Pasuruan. Pertumbuhan tanaman dilakukan dengan cara menanam tebu genjah PS 87-22643 (V_1) dan non genjah M 442-51 (V_2) ke dalam polybag yang telah berisi tanah. Bahan tanaman berupa bibit semai dari bagal mata satu yang berumur 2 minggu. Setiap polybag hanya berisi satu bibit. Pupuk P dan K diberikan bersamaan dengan waktu penanaman dengan dosis sesuai anjuran yaitu 1 ku SP 36/ha dan 2 ku 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 (tanpa pemupukan), 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, dan N_3 : 150 kg N/ha (150 % dosis N anjuran), setara dengan 1,165 g Urea/polybag. Pemeliharaan tanaman yang meliputi penyiraman dan pengendalian hama penyakit dilakukan sesuai baku teknis dengan memperhatikan kondisi lapangan.

Daun yang dipilih untuk pengujian aktivitas enzim, total protein terlarut, dan kandungan klorofil adalah daun k+1 (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 dalam N_2 cair. Penelitian ini dilaksanakan di Rumah kaca Fakultas Pertanian dan Laboratorium Biologi Molekul Universitas Jember mulai bulan Maret 2002 sampai Juli 2002.

3.2 Ekstraksi Enzim

Daun sebanyak 2-3 gram digerus dengan menggunakan mortal stumper dingin ditambah dengan N_2 cair dan sedikit pasir kuarsa. Setelah halus ditambahkan 3 kali larutan buffer yang sesuai yaitu 100 mM Tris-HCl (pH 7,5)

yang mengandung 10 mM MgCl₂, 1-mM EDTA, 5 mM DTT, 0,5 mM PMSF dan ditambah 10 % PVP. Hasil ekstraksi (ekstraktan) disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Ekstrak kasar kemudian disaring dengan menggunakan kolom kromatografi Sephadex G-25 yang sebelumnya telah diekuilibrisasi dengan larutan buffer yang sama pada temperatur 4 °C. Eluate yang didapat digunakan untuk analisa enzim. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan sebelum pemupukan yaitu pada saat tanaman berumur 2 bulan atau 0 hari, 3 dan 6 hari setelah pemupukan N.

3.3 Pengukuran Aktivitas Enzim PEPC

Larutan penguji (*reaction mixture*) enzim PEPC adalah 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 20 mM DTT, 5 mM NADH, 2 IU MDH, 50 mM PEP dan H₂O. Menambahkan sumber enzim sebanyak 25 µL. Aktivitas enzim diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm.



3.4 Analisis Western Blotting

Sampel protein sebanyak 20 µg diinjeksikan ke sumuran dan dipisahkan dengan SDS-PAGE dengan konsentrasi gel sebesar 12,5 %. Kemudian protein dalam sumuran gel plate dibiarkan bergerak berdasar berat molekulnya. Setelah melalui proses running elektroforesis, protein ditranfer ke membran nitroselulose dengan menggunakan arus listrik. Kemudian direaksikan dengan antibodi spesifik untuk Rubisco. Visualisasikan kandungan enzim dengan menggunakan pewarnaan BCIP dan NBT. Kandungan enzim Rubisco dapat ditunjukkan dengan melihat blot yang terbentuk.

3.5 Penentuan Kandungan Total Protein Terlarut dan Klorofil

Metode yang digunakan untuk menentukan total protein terlarut adalah metode Bradford *et al.*, (1976). Kandungan 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. Kandungan klorofil total (a+b) diukur menurut metode Wintermans dan Demonts (1965). Ekstrak daun sebanyak 0,114 mL ditambah dengan etanol 99,8 % sebanyak 2,886 mL. Sentrifuge selama 5 menit. Ambil supernatan dan ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 649 nm dan 665 nm. Kandungan klorofil (a+b) ditentukan dengan rumus :

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

3.6 Penentuan Biomassa dan Tinggi Tanaman

Penentuan biomassa dan tinggi tanaman dilakukan pada saat tanaman berumur 3 bulan. Berat biomassa tanaman 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.

V. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Pemupukan nitrogen meningkatkan aktivitas enzim PEPC pada kedua klon tebu sedangkan kandungan enzim Rubisco tidak terpengaruh dengan adanya penambahan sumber N dalam tanah. Semakin tinggi dosis pupuk N yang diberikan dapat meningkatkan aktivitas enzim PEPC. Aktivitas PEPC dan kandungan Rubisco pada klon tebu non genjah lebih tinggi dibanding klon tebu genjah. Pertumbuhan klon tebu non genjah lebih baik dibanding klon tebu genjah. Pada klon tebu non genjah, pertumbuhan terbaik terjadi pada pemberian pupuk N dengan dosis 100 kg N/ha sedangkan pada tebu genjah dengan dosis 100 kg N/ha dan 150 kg N/ha.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan tentang aktivitas enzim yang bertanggung jawab terhadap biosintesis sukrosa yaitu enzim *sucrose phosphate synthase* (SPS) dan mekanisme transport sukrosa pada tanaman tebu, terutama tebu genjah.



DAFTAR PUSTAKA

- Bradford, M.M. 1976. "A Rapid and Sensitive Methods for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-dye Binding". *J. Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Eichelmann, H. and A. Låisk. 1999. "Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/oxygenase Content, Assimilatory Charge, and Meshopyll Conductance in Leaves". *J. Plant Physiol.* 119: 179-189.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce and R.L. Mitchell. 1985. *Physiology of Crop Plants*. Netherland: The Iowa State University Press. 428.
- Hadiwigeno, S. 1991. *Industri Gula di Indonesia*. Pasuruan: BP3G Pasuruan. 148.
- Hakim, N. 1986. *Dasar-dasar Ilmu Tanah*. Lampung: Penerbit Universitas Lampung. 213.
- Heddy, S. 1990. *Biologi Pertanian*. Jakarta: Penerbit Rajawali Pers. 282.
- Hopkins, W.G. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. New York: John Wiley and Sons, Inc. 464.
- Indriani, Y.H. dan E. Sumiarsih. 1992. *Pembudidayaan Tebu di Lahan Sawah dan Tegal*. Jakarta: PT. Penebar Swadaya. 112.
- Klein, R.M. 1987. *The Green World: An Introduction to Plants and People*. New York: Harper and Row Publisher. 618.
- Lakitan, B. 1995. *Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta: PT. RajaGrafindo Persada. 201.
- Lancien, M., P. Gadal and M. Hodges. 2000. "Enzyme Redundancy and the Importance of 2-oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation". *J. Plant Physiol.* 123: 817-824.
- Lawlor, D.W. 1993. *Photosynthesis: Molecular, Physiological and Environmental Processes*. Second edition. Longman Scientific & Technical. 318.
- Lea, P.J. and R.C. Leegod. 1996. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons. 312.
- 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. 682.
- Sugiharto, B. and T. Sugiyama. 1992. "Effects of Nitrate and Ammonium on Gene Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Nitrogen Metabolism in Maize Leaf Tissue during Recovery from Nitrogen Stress". *J. Plant Physiol.* 98: 1403-1408.
- Sugiharto, B., T. Handoyo dan Sumadi. 1996. "Variasi dan Korelasi Enzim Fotosintetik dan Enzim Metabolisme Sukrosa pada beberapa Varietas Tebu". *J. Zuriat.* 7: 76-84.
- 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. 94.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 1991. *Plant Physiology*. California: The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. 565.
- Ueno, O. 2001. "Environmental Regulation in the Amphibious Sedge *Eleocharis vivipara*". *J. Plant Physiol.* 80: 1524-1532.
- 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

Lampiran 1. Perhitungan Dosis Pupuk per Hektar

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

- N : 0,12 %
- P₂O₅ : 75 ppm
- K₂O : 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 dengan pupuk Urea (46 % N) sebesar:

$$100/46 \times 100 \text{ kg Urea} = 217,39 \text{ kg Urea.}$$

b. Menentukan dosis pupuk P

P tanah sebesar 75 ppm tergolong tinggi, berdasarkan nomograf seharusnya tidak ditambah pupuk P. Namun untuk tindakan preventif ditambahkan 1 ku SP 36/ha.

c. Menentukan dosis pupuk K

K tanah sebesar 156 ppm tergolong sedang, anak panah nomograf menunjuk angka $\pm 117,5$ berarti tanah tersebut perlu dipupuk 117,5 kg K₂O /ha, atau dengan pupuk KCl (60 % K₂O) sebesar :

$$117,5/60 \times 100 \text{ kg KCl} = 195,8 \text{ KCl/ha, pembulatan 2 ku KCl/ha.}$$

Lampiran 2. Tata Letak Percobaan

Macam Perlakuan :

Varietas V_1 : PS 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 SP 36/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_1N_1
V_2N_0	V_2N_1	V_1N_2	V_1N_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 4. Tabel Data Biomassa Tanaman

Sampel	Ulangan				Rata-rata
	I	II	III	IV	
V ₁ N ₀	62,55	62,22	56,01	59,24	60,01
V ₁ N ₁	90,37	90,28	90,11	113,04	95,95
V ₁ N ₂	134,23	102,52	98,44	120,80	114,00
V ₁ N ₃	143,39	143,85	72,29	150,78	127,58
V ₂ N ₀	58,56	61,07	54,69	46,95	55,32
V ₂ N ₁	118,58	79,05	128,81	120,91	111,84
V ₂ N ₂	122,91	131,64	129,59	135,29	129,86
V ₂ N ₃	112,81	128,19	120,03	134,66	123,92

Lampiran 5. Tabel Analisis Sidik Ragam Biomassa Tanaman RAL 2 Faktor

Sumber Keragaman	db	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	7	24,520.97	3,503.00	11.49*	2.42
Faktor I	1	273.91	273.91	0.90 ns	4.26
Faktor II	3	23,442.38	7,814.13	25.64*	3.01
Interaksi	3	804.69	268.23	0.88 ns	3.01
Galat	24	7,314.69	304.78		
Total	31	31,835.66			

Koefisien Keragaman = 17,06 %

Lampiran 6. Tabel Data Tinggi Tanaman

Sampel	Ulangan				Rata-rata
	I	II	III	IV	
V ₁ N ₀	61,00	71,00	68,00	81,00	70,25
V ₁ N ₁	104,00	99,00	91,00	108,50	100,63
V ₁ N ₂	112,00	97,00	109,00	119,00	109,25
V ₁ N ₃	80,00	112,00	99,00	101,50	98,13
V ₂ N ₀	87,00	80,00	85,00	75,00	81,75
V ₂ N ₁	127,00	117,00	95,20	112,00	112,80
V ₂ N ₂	129,00	121,00	138,00	111,50	124,88
V ₂ N ₃	122,00	122,50	116,00	111,00	117,88

Lampiran 7. Tabel Analisis Sidik Ragam Tinggi Tanaman RAL 2 Faktor

Sumber Keragaman	db	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	7	9,517.97	1,359.71	14.50*	2.42
Faktor I	1	1,743.44	1,743.44	18.60*	4.26
Faktor II	3	7,688.59	2,562.86	27.34*	3.01
Interaksi	3	85.94	28.65	0.31 ns	3.01
Galat	24	2,250.19	93.76		
Total	31	11,768.16			

Koefisien Keragaman = 9.50 %

