



**PENGARUH CEKAMAN TIMBAL (Pb) TERHADAP SIFAT FISILOGI
TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.)**

SKRIPSI

Oleh

**Nyomik Supriono
NIM. 051510101059**

**JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2010**



**PENGARUH CEKAMAN TIMBAL (Pb) TERHADAP SIFAT FISILOGI
TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.)**

SKRIPSI

**Diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan
Untuk menyelesaikan Program Sarjana pada
Program Studi Agronomi Jurusan Budidaya Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Jember**

**Oleh :
Nyomik Supriono
NIM. 051510101059**

**JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2010**

SKRIPSI

**PENGARUH CEKAMAN TIMBAL (Pb) TERHADAP SIFAT FISILOGI
TANAMAN JAGUNG (*Zea mays L.*)**

Oleh :

**Nyomik Supriono
NIM. 051510101059**

Pembimbing :

**Pembimbing Utama : Dr. Tri Handoyo, SP
Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS**

PENGESAHAN

Skripsi berjudul : Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Sifat Fisiologi

Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian

Pada :

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Pertanian

Tim Penguji

Penguji 1,

Dr. Tri Handoyo, SP
NIP.197112021998021001

Penguji 2

Penguji 3

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS
NIP.196504261994031001

Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS
NIP.196003171983032001

Mengesahkan

Dekan

Dr. Ir. Bambang Hermiyanto, MP
NIP. 196111101988021001

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nyomik Supriono

NIM : 051510101059

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Sifat Fisiologi Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isi sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 25 Mei 2010

Yang menyatakan

Nyomik Supriono
NIM. 051510101059

RINGKASAN

Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Sifat Fisiologi Tanaman Jagung.

Nyomik Supriono. 051510101059. 2010. Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Kegiatan manusia dibidang industri dan pertanian menyebabkan meningkat luas lahan yang terkontaminasi logam berat. Penggunaan bahan agrokimia tidak terkendali di lahan pertanian (seperti pupuk fosfat dan pestisida) dapat meningkatkan resistensi hama atau penyakit tanaman, terbunuhnya musuh alami, dan organisme berguna lainnya, serta menyebabkan akumulasi zat kimia berbahaya dalam tanah dan bahan pangan. Pencemaran logam berat di dalam tanah dapat dibersihkan menggunakan tanaman, sehingga perlu penelitian tentang cekaman timbal terhadap perubahan sifat fisiologi tanaman. Penelitian ini mempelajari perubahan sifat fisiologis tanaman jagung dalam kondisi cekaman timbal, yaitu perubahan kandungan enzim fotosintesis.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember dan di Green House Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juli 2009 sampai dengan Desember 2009. Penelitian terdiri dari 4 perlakuan yaitu P₀ (tanpa pemberian Pb), P₁ (pemberian Pb sebanyak 4 gr); P₂ (pemberian Pb sebanyak 8 gr); dan P₃ (pemberian Pb sebanyak 16 gr). Pengambilan sampel dilakukan pada saat tanaman berumur 40 HST. Parameter yang diamati meliputi kandungan PEPC, Rubisco, Total Protein, tinggi tanaman dan Berat Kering.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman jagung yang telah diberi perlakuan cekaman timbal terjadi peningkatan kandungan PEPC dan Rubisco. Cekaman timbal menyebabkan meningkatnya laju fotosintesis yang digambarkan oleh meningkatnya kandungan PEPC dan Rubisco tanaman jagung.

SUMMARY

Effect of Lead Stress on Physiological Characteristic of Corn (*Zea mays*).

Nyomik Supriono. 051510101059. 2010. Program Study of Agronomy, Faculty of Agriculture, Jember University

Human activities in industrial and agricultural sectors caused the increase of heavy metal land contamination. Uncontrolled of agrochemicals uses in agricultural land (such as phosphate fertilizer and pesticide) can improve pest resistance, plant diseases, killing of natural enemies, other useful organisms, and cause the accumulation of chemicals hazardous in soil and foodstuffs. Heavy metal contamination in the soil can be cleaned using plants, so the research on the physiological responses of plant on the lead stress was important to do. This research studied the changes in physiological properties of maize plants in stress of lead, which changes the content of photosynthetic enzymes.

Research conducted at the Laboratory of Molecular Biology, University of Jember and in the Green House Faculty of Agriculture University of Jember. This research was started from July 2009 until December 2009. The study consisted of four treatments: P₀ (without Pb), P₁ (Pb giving as much as 4 ounces); P₂ (Pb giving as much as 8 ounces), and P₃ (Pb giving as much as 16 ounces). Samples were collected at 40 days after planting. The research observed the content of PEPC, Rubisco, protein total, height of plant, and Dry Weight.

Results showed that the PEPC and Rubisco contents in maize leaves increased during the lead stress conditions. The lead stress caused the increasing photosynthesis rate, which was described by the increasing content of PEPC and Rubisco in maize leaves.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah tertulis (skripsi) ini yang berjudul “Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Sifat Fisiologi Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)”.

Penyusunan karya ilmiah tertulis (skripsi) ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

- 1) Kedua orang tuaku dan semua saudaraku yang telah mendidik dan memberikan doa serta kasih sayang dan motivasi.
- 2) Dr. Tri Handoyo, SP., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan arahan dan bimbingan sampai terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis ini.
- 3) Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan arahan dan bimbingan sampai terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis ini.
- 4) Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS., selaku Dosen Pembimbing Akademik terima kasih atas saran dan bimbingan sampai terselesaikannya Karya Tulis Ilmiah ini.
- 5) Dr. Ir. Bambang Hermiyanto, MP., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember beserta staffnya.
- 6) Ir. Bambang Kusmanadhi, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember beserta staffnya.
- 7) Direktorat jenderal pendidikan tinggi, Departemen Pendidikan Nasional melalui Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian yang telah membiayai penelitian ini.
- 8) Keluarga besar BIOMOL, semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu terima kasih semuanya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Penulis

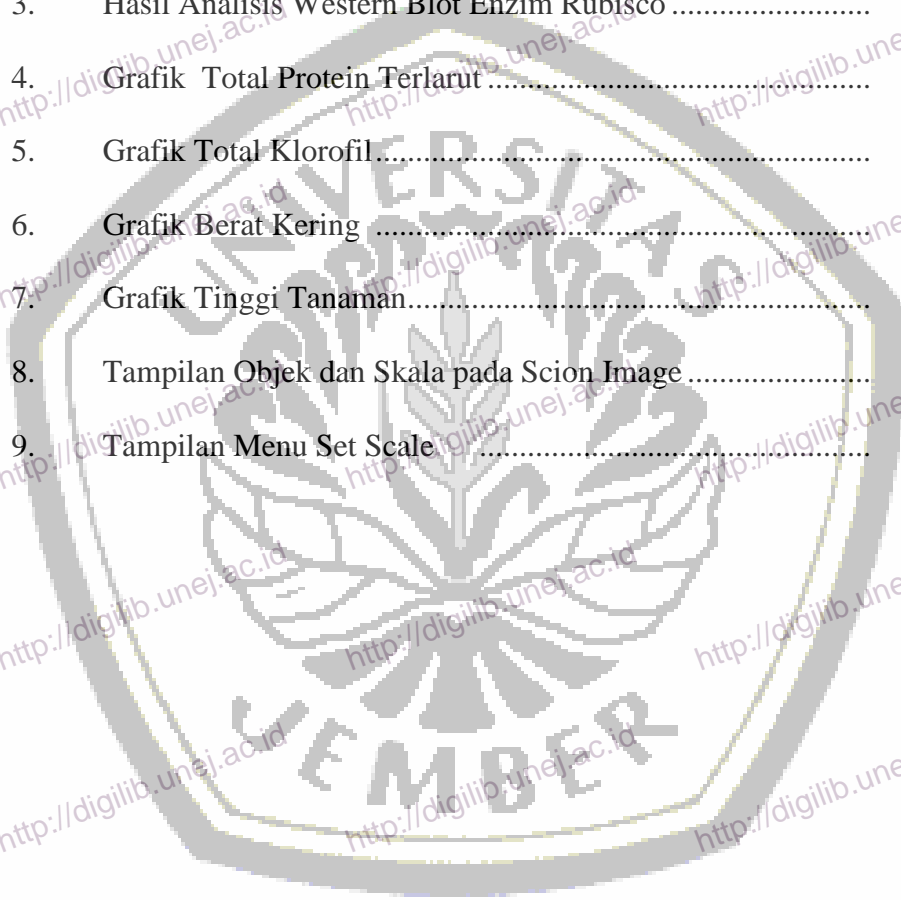
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
RINGKASAN	v
SUMMARY	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Timbal Sebagai Logam Pencemar	4
2.2 Akumulasi Timbal dalam Tanah dan Tanaman	5
2.3 Pengaruh Timbal terhadap Proses Fisiologi Tanaman Jagung....	5
2.4 Hipotesis	9
BAB 3. METODE PENELITIAN	10
3.1 Tempat dan Waktu Percobaan	10
3.2 Bahan dan Alat	10
3.2 Bahan	10

3.2 Alat.....	10
3.3 Pelaksanaan Percobaan.....	10
3.3.1 Kondisi Umum Percobaan.....	10
3.3.2 Cara Ekstraksi Protein.....	11
3.3.3 Penentuan Kandungan PEPC dan Rubisco menggunakan <i>Sodium Dodecyl – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)</i> dan <i>Western Blot</i>	11
3.3.4 Pengukuran Kandungan Klorofil.....	12
3.3.5 Pengukuran Kandungan Protein Terlarut.....	12
3.3.6 Parameter Percobaan.....	13
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	14
4.1 Perubahan Morfologi Tanaman Jagung tercekam Pb.....	14
4.2 Pengaruh Cekaman Timbal terhadap Fisiologi Tanaman.....	15
4.2.1 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap PEPC.....	15
4.2.2 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Rubisco.....	16
4.2.3 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Kandungan Total Protein.....	18
4.2.4 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Kandungan Klorofil.....	19
4.3 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Berat Kering.....	21
4.4 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Tinggi Tanaman.....	23
BAB 5. SIMPULAN DAN SARAN.....	25
5.1 Simpulan.....	25
5.2 Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA.....	26
LAMPIRAN.....	30

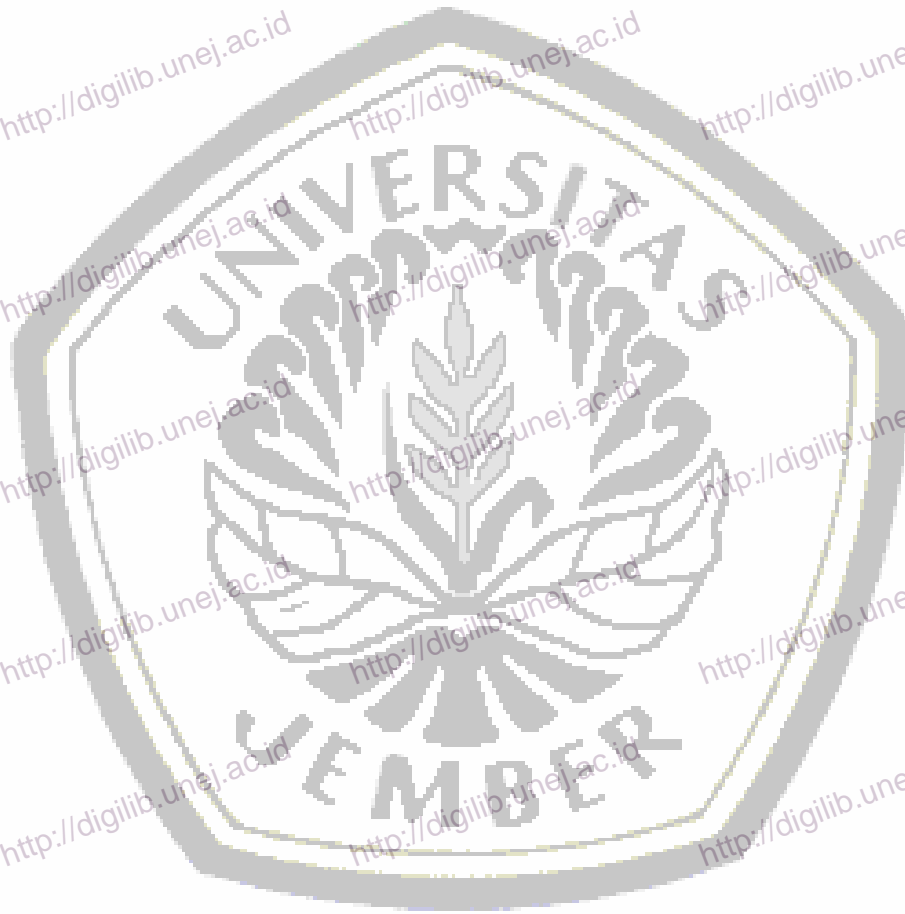
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Perbedaan morfologi tanaman jagung	14
2. Hasil Analisis Western Blot Enzim PEPC.....	15
3. Hasil Analisis Western Blot Enzim Rubisco	17
4. Grafik Total Protein Terlarut	19
5. Grafik Total Klorofil.....	20
6. Grafik Berat Kering	22
7. Grafik Tinggi Tanaman.....	23
8. Tampilan Objek dan Skala pada Scion Image.....	31
9. Tampilan Menu Set Scale	31



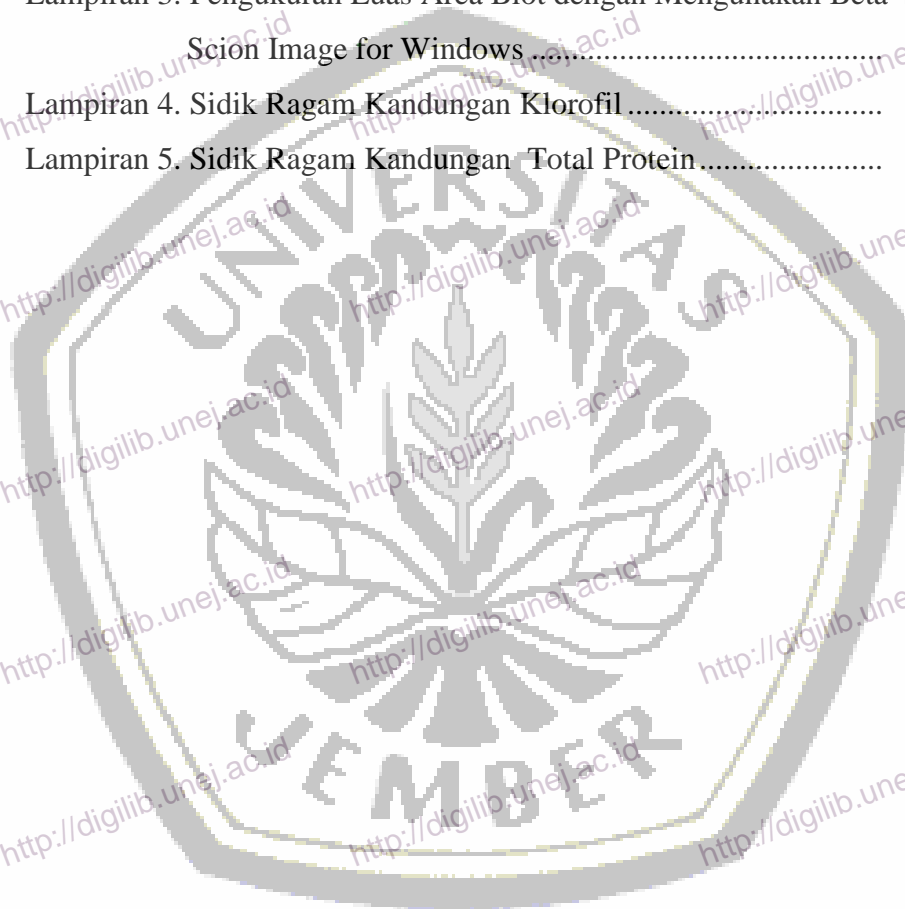
DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Hasil Pengukuran Luas Area Blot Enzim PEPC.....	16
2. Hasil Pengukuran Luas Area Blot Enzim Rubisco.....	17



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Analisa Western Blot Enzim Rubisco	30
Lampiran 2. Analisa Western Blot Enzim PEPC.....	30
Lampiran 3. Pengukuran Luas Area Blot dengan Menggunakan Beta 4.0.3 of Scion Image for Windows	30
Lampiran 4. Sidik Ragam Kandungan Klorofil.....	32
Lampiran 5. Sidik Ragam Kandungan Total Protein.....	33



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Timbal (Pb) merupakan logam berat dengan konsistensi lunak dan berwarna hitam. Banyak industri yang menggunakan Pb sebagai bahan baku misalnya industri baterai dan aki serta banyak pula industri yang menghasilkan produk yang mengandung Pb misalnya industri cat dan bahan pewarna lainnya. Unsur logam berat adalah unsur yang mempunyai densitas lebih dari 5 gr/cm^3 . Batuan mengandung 13 mg/kg Pb, khususnya batuan fosfat mempunyai kadar lebih besar yaitu 100 mg/kg. Tanah mengandung Pb 5 – 25 mg/kg dan air tanah (*ground water*) berkisar 1- 60 ug/liter. Air sungai memiliki kadar Pb 1–10 ug/liter. Air laut memiliki kadar Pb lebih rendah daripada air tawar (Sudarmadji, 2006).

Timbal (Pb) merupakan polutan utama di darat maupun di perairan. Selain proses pelapukan alamiah sumber utama pencemaran Pb adalah asap knalpot mobil, cerobong asap pabrik yang menggunakan Pb, limbah dari baterai penyimpanan, industri, pertambangan dan peleburan bijih Pb, logam plating dan pupuk, pestisida dan aditif bensin (Eick, 1999). Endapan limbah atau kotoran yang berisi sejumlah besar Pb secara teratur dibuang ke kebun dan lahan (Paivoke, 2002). Tanah tercemar timbal (Pb) mengandung kisaran $400 - 800 \text{ mg kg}^{-1}$ tanah sedangkan daerah industri dapat mencapai $1000 \text{ mg Pb.Kg}^{-1}$ tanah (Angelon, 1992). Kandungan Pb dalam organ tanaman cenderung menurun dalam urutan sebagai berikut : akar > daun > batang > bunga > biji. Namun urutan ini dapat bervariasi dengan jenis tanaman (Antosiewicz, 1992). Tanah tercemar timbal (Pb) dapat mengancam kehidupan biota tanah dan tanaman. Konsentrasi toksik terhadap daun tanaman adalah $30 - 300 \mu\text{g Pb g}^{-1}$ (Alloway, 1997).

Bahan kimia pertanian mengandung banyak timbal. Pestisida mengandung timbal arsenat yang dapat mencemari tanah pertanian. Secara bertahap pemakaian bahan agrokimia (pupuk dan pestisida) dalam sistem budidaya pertanian harus dikurangi, karena bahan agrokimia mengandung logam berat yang termasuk bahan beracun berbahaya. Penggunaan bahan agrokimia yang tidak terkendali

pada lahan pertanian terutama pada tanaman sayur-sayuran berdampak negatif, antara lain meningkatnya resistensi hama atau penyakit tanaman, terbunuhnya musuh alami dan organisme yang berguna, serta terakumulasinya zat-zat kimia berbahaya dalam tanah (Sutamiharja, 1985). Tanah pertanian yang mengandung logam berat menyebabkan produktifitas dan kualitas hasil pertanian turun (Subowo, 1999).

Peningkatan timbal (Pb) dalam tanah dapat berdampak negatif pada tanah dan produktivitas tanaman bahkan konsentrasi yang sangat rendah dapat menghambat beberapa proses penting tanaman, seperti fotosintesis, mitosis dan penyerapan air. Gejala keracunan timbal (Pb) menunjukkan daun gelap, layu dan akar kerdil, pendek dan cokelat (Patra, 2004).

Penyerapan Pb oleh tanaman menunjukkan bahwa akar memiliki kemampuan untuk mengambil Pb dalam jumlah yang signifikan, sementara secara bersamaan sangat membatasi translokasinya ke bagian atas tanah (Lane, 1977). Gagasan ini telah dibantah oleh Miller dan Koeppel (1971) yang menunjukkan bahwa jagung (*Zea Mays L*) adalah tanaman yang dapat memindahkan dan mengumpulkan Pb dalam jumlah yang signifikan dalam daun yang konsentrasinya tergantung sejauh mana Pb memasuki tanaman. Namun sebagian besar Pb diambil oleh tanaman tetap melalui akar (Kumar, 1995).

1.2 Rumusan Masalah

Pencemaran tanah oleh logam berat timbal (Pb) dapat menyebabkan semakin menurunnya produksi tanaman. Untuk mengurangi kerugian akibat pencemaran logam berat perlu diketahui tanaman yang tahan terhadap cekaman timbal sehingga produksi tanaman tetap tinggi. Tanaman Jagung diduga memiliki sifat fitoremediator tinggi. Untuk mengetahui tanaman yang mempunyai daya tahan tinggi terhadap cekaman logam berat dilakukan analisa kandungan PEPC dan Rubisco menggunakan *Western Blot*. Enzim fotosintesis merupakan gerbang proses fisiologi dalam suatu tanaman terutama pada asimilasi karbon sehingga perlu dilakukan analisa perubahan kandungan PEPC dan Rubisco akibat pengaruh logam berat timbal (Pb). PEPC dan Rubisco merupakan salah satu parameter yang

menentukan kemampuan suatu tanaman dalam mengatasi kondisi cekaman logam berat.

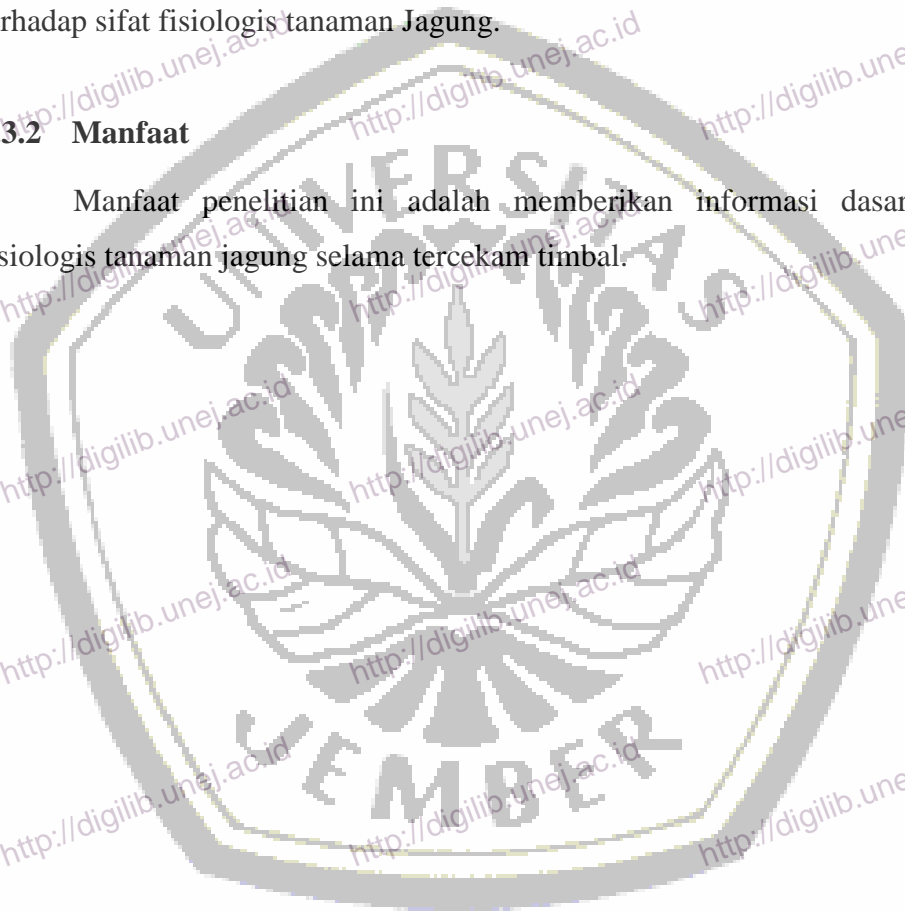
1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh cekaman Pb terhadap sifat fisiologis tanaman Jagung.

1.3.2 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi dasar karakter fisiologis tanaman jagung selama tercekam timbal.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Timbal Sebagai Logam Pencemar

Organ Tanaman mengakumulasi sebagian timbal, pada daun, batang, akar, dan akar umbi-umbian. Pada pemberian 150 ppm Pb, pertumbuhan dan berat kering caisim menurun. Adanya logam berat dalam tanah menyebabkan perubahan KTK, dan perubahan komposisi unsur hara tanah. Unsur hara menjadi tidak tersedia, sehingga menghambat serapan hara tanaman dan menyebabkan produktifitas menurun.

Logam berat berada dalam tanah, air dan udara dengan suatu mekanisme masuk kedalam makhluk hidup. Tanaman menjadi mediator penyebaran logam berat pada makhluk hidup, menyerap logam berat melalui akar dan daun (stomata). Dengan digunakannya tanaman sebagai pakan baik pada manusia maupun hewan menyebabkan berpindahnya logam berat yang dikandung oleh makanan seperti timbal (Pb) kedalam tubuh makhluk hidup lainnya. Logam berat yang masuk kedalam tubuh manusia akan melakukan interaksi antara lain dengan enzim, protein, DNA, serta metabolit lainnya. Adanya logam berat dalam tubuh jelas akan berpengaruh terhadap tubuh. Bila jumlahnya berlebih, maka akan berbahaya bagi tubuh.

Pengendalian pencemaran lingkungan merupakan program keamanan pangan nasional yang harus segera dilaksanakan, terlebih lagi akan memasuki era perdagangan bebas. Produk-produk pertanian dituntut mempunyai standar mutu yang baik serta aman dikonsumsi. Menurut Subowo et al. (1999) adanya logam berat dalam tanah pertanian dapat menurunkan produktifitas pertanian dan kualitas hasil pertanian selain dapat membahayakan kesehatan manusia melalui konsumsi pangan yang dihasilkan dari tanah yang tercemar logam berat tersebut.

Secara bertahap pemakaian bahan agrokimia (pupuk dan pestisida) dalam sistem budidaya pertanian harus dikurangi, karena bahan agrokimia mengandung logam berat yang termasuk bahan beracun berbahaya (B3). Penggunaan bahan agrokimia yang tidak terkontrol pada lahan pertanian terutama pada tanaman

sayur-sayuran berdampak negatif, antara lain meningkatnya resistensi hama atau penyakit tanaman, terbunuhnya musuh alami dan organisme yang berguna, serta terakumulasinya zat-zat kimia berbahaya dalam tanah (Sutamiharja,1985).

Logam berat terserap kedalam jaringan tanaman melalui akar, yang selanjutnya akan masuk kedalam siklus rantai makanan. Logam akan terakumulasi pada jaringan tubuh dan dapat menimbulkan keracunan bagi manusia, hewan, dan tumbuhan apabila melebihi batas toleransi. Di Indonesia, kadar residu pestisida yang terkandung dalam bahan pangan dan sayuran cukup memprihatinkan, Sayuran seperti wortel, kentang, sawi, bawang merah, cabe merah dan kubis dari berbagai tempat budidaya sayuran di Jawa Barat dan Jawa Tengah pada tahun 1987 diketahui mengandung residu yang melampaui batas maksimum (Gayatri, 1994).

2.2 Akumulasi Timbal dalam Tanah dan Tanaman

Kandungan logam berat didalam tanah secara alamiah sangat rendah, kecuali tanah tersebut sudah tercemar. Kandungan logam dalam tanah sangat berpengaruh terhadap kandungan logam pada tanaman yang tumbuh di atasnya, kecuali terjadi interaksi diantara logam itu sehingga terjadi hambatan penyerapan logam tersebut oleh tanaman. Akumulasi logam dalam tanaman tidak hanya tergantung pada kandungan logam dalam tanah, tetapi juga tergantung pada unsur kimia tanah, jenis logam, dan spesies tanaman (Darmono, 1995). Konsentrasi timbal yang tertinggi (100-1000 mg/kg) akan mengakibatkan pengaruh toksik pada proses fotosintesa dan pertumbuhan (Anonim, 1998). Kurniawansyah dkk. (1999) menyatakan bahwa kandungan Pb dalam tanah sampai dengan 2000 ppm telah menyebabkan akumulasi Pb dalam daun caisim melebihi maksimum yang diperbolehkan (2 ppm).

2.3 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Proses Fisiologis Tanaman Jagung

Smith (1981) menyebutkan bahwa sejumlah besar logam berat dapat terasosiasi dengan tumbuhan tinggi. Logam berat yang belum diketahui fungsinya

dalam metabolisme tumbuhan antara lain adalah Pb, Cd, dan Ti. Semua logam berat tersebut dapat berpotensi mencemari tumbuhan. Mekanisme pencemaran logam secara biokimia pada tumbuhan yang terbagi ke dalam enam proses yaitu: (1) logam mengganggu fungsi enzim, (2) logam sebagai anti metabolit, (3) logam membentuk lapisan endapan yang stabil (kelat) dengan metabolit esensial, (4) logam sebagai katalis dekomposisi pada metabolit esensial, (5) logam mengubah permeabilitas membran sel, (6) logam menggantikan struktur dan elektrokimia unsur yang paling penting dalam sel. Gejala akibat pencemaran logam berat, yakni klorosis, nekrosis pada ujung dan sisi daun serta busuk daun yang lebih awal. Gugus asam karboksilat (-COOH) dan gugus amino (-NH₂) dalam asam amino juga dapat diserang oleh logam berat. Logam berat dapat mengendapkan senyawa-senyawa fosfat biologis, disamping juga dapat mengkatalis penguraiannya (Manahan, 1977).

Timbal (Pb) merupakan unsur logam yang pada umumnya menjadi katalis pada berbagai reaksi termasuk dengan enzim. Keadaan ini akan mempengaruhi membran biologi (baik sel maupun organel-organelnya). Fakta menunjukkan bahwa membran biologis tidak benar-benar impermeabel, membran tersebut memungkinkan terjadinya difusi ion dan molekul ditambah keberadaan enzim dalam membran tersebut yang secara langsung dapat mempengaruhi transportasi ion dan molekul untuk melewati membran.

Mengel dan Kirby (1987) menyebutkan bahwa secara biokimia Pb berfungsi menghambat sistem enzim dalam mengkonversi asam amino dan pencemaran tumbuhan oleh Pb akan sangat membahayakan kesehatan dan mengurangi laju pertumbuhan tanaman. Kadar Pb normal dalam tumbuhan berkisar antara 2-3 ppm. Vegetasi di sekitar jalan raya dapat menyerap Pb sampai 50 ppm dimana Pb yang dijerap diakumulasikan dalam dinding sel. Nilai kisaran normal kandungan logam Pb pada tanaman kehutanan di Amerika Serikat berkisar antara 10-300 ppm (Smith, 1981).

Berat kering total hasil panen tanaman budidaya di lapangan merupakan akibat dari penimbunan hasil bersih asimilasi CO₂ sepanjang musim pertumbuhan, karena asimilasi CO₂ merupakan hasil penyerapan energi matahari dan akibat

radiasi matahari, berdasarkan keadaan musiman didistribusikan secara merata ke seluruh permukaan bumi, sehingga faktor utama yang mempengaruhi berat kering total hasil panen adalah radiasi matahari yang diabsorpsi dan CO₂ (Gardner, 1991). Menurut Hatch dan Slack (1996) bahwa pada tanaman C₄, CO₂ dalam mesofil sel diikat oleh enzim *Phosphoenolpyruvat Carboxylase* (PEPC). Bila aktivitas PEPC meningkat, maka fiksasi CO₂ akan meningkat pula, sehingga dapat disimpulkan bahwa peranan enzim PEPC dalam tanaman C₄ adalah untuk mengikat (fiksasi) CO₂ selanjutnya melalui proses fotosintesis akan diproses menjadi bahan organik sebagai penyusun berat kering tanaman (Soetopo, 1990).

Jagung merupakan jenis tanaman C₄ diketahui bahwa aktivitas enzim PEPC menentukan tingkat asimilasi karbon dan produksi biomass (Sugiyama dan Hirayama, 1983). Menurut Kazuhiro (2007), rubisco merupakan enzim fotosintesis dan merupakan protein terbanyak pada daun yang nilainya sekitar 12-35 % dari total N pada daun tanaman C₃. Seperti juga dinyatakan oleh Salisbury (1995) bahwa rubisco mungkin merupakan bentuk protein paling banyak dijumpai di muka bumi ini. Kloroplas mengandung sekitar separuh dari total protein pada daun dan diantara protein kloroplas seperempat sampai separuhnya merupakan rubisco. Jadi. Seperempat sampai seperdelapan protein pada daun adalah dalam bentuk enzim rubisco.

Tanaman merespon cekaman lingkungan melalui perubahan morfologi, fisiologi dan metabolit yang terjadi pada seluruh tanaman (Cellier, 1998). Menurut Arthon (1990) *Phosphoenolpyruvat Carboxylase* merupakan enzim utama yang mengasimilasi CO₂ pada tanaman C₄. PEPC mengkatalisa reaksi karboksilasi PEP untuk membentuk oxaloasetat. Selanjutnya asimilasi karbon yang terbentuk membentuk gugus C₄ carboxyl. Reaksi tersebut oleh Slach dan Hatch (1967) dijelaskan bahwa PEPC mengkatalisa PEP menjadi oxaloasetat (OAA) merupakan reaksi yang tidak dapat balik, yang terjadi dalam sitosol mesofil tanaman C₄, ini merupakan reaksi karboksilasi utama dalam fotosintesa C₄ (Asthon, 1990).

Anderson dan Beardell (1991) mengemukakan bahwa enzim PEPC menghendaki Mg²⁺ untuk aktivitasnya. Berbeda dengan enzim *ribulosa - 1.5 biphosphate carboxylase/Oxygenase* (RuBPCase), substrat dari PEPC adalah HC₃O⁻

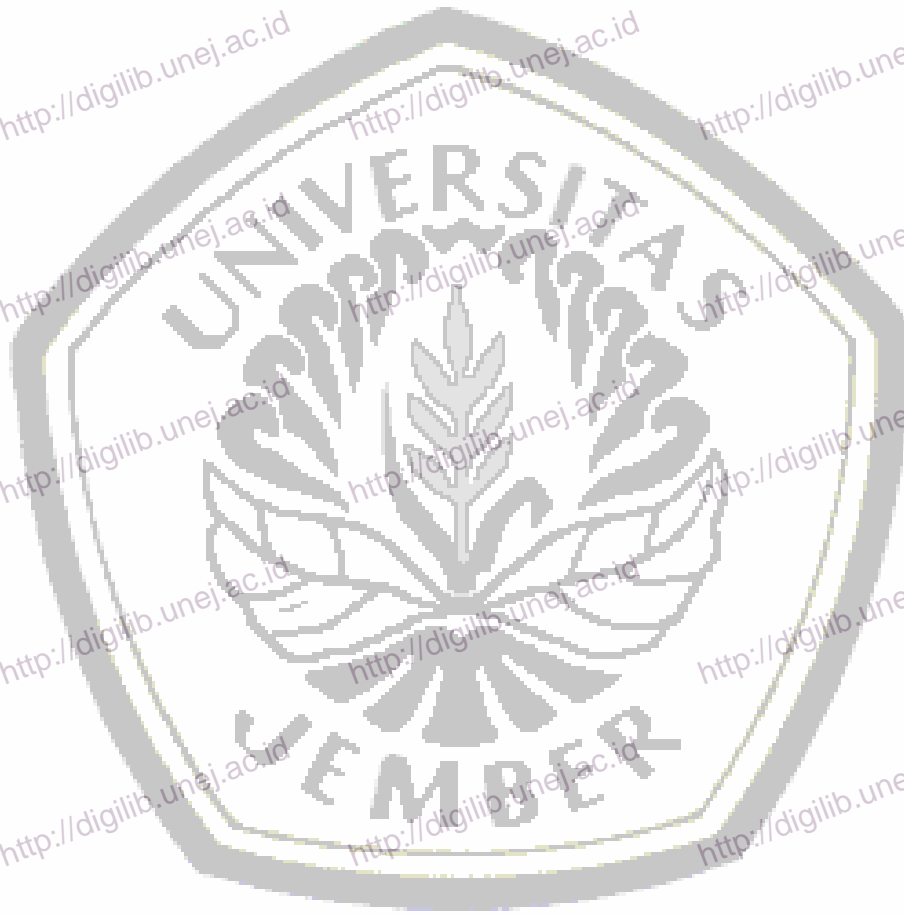
bukan CO₂. Satu hal lagi yang membedakan enzim PEPC dengan enzim RuBP adalah enzim PEPC tidak bereaksi dengan O₂ serta tidak sensitif terhadap reaksi tersebut. Keadaan ini menandakan suatu persenyawaan yang besar pada mekanisme karboksilasi C₄ dalam *Bundle Sheat Cells*. Ketidaksensitifan tanaman C₄ dengan O₂ dalam asimilasi CO₂, menyebabkan tanaman C₄ tidak terjadi fotorespirasi sehingga efisiensi fotosintesisnya tinggi.

Tinggi tanaman menggambarkan terjadinya proses pertumbuhan di daerah meristematik, ujung dan apikal. Peningkatan tinggi tanaman jagung ini berarti akan meningkatkan pula jumlah daun yang terbentuk atau berat segar biomassa. Tinggi tanaman merupakan ukuran tanaman yang sering diamati baik sebagai indikator pertumbuhan maupun sebagai parameter yang digunakan untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan (Sitompul, 1995).

Menurut Harbone (1987) selain untuk memurnikan protein. Elektroforesis gel merupakan cara untuk membandingkan secara langsung berbagai komponen penting protein atau enzim dari berbagai organisme. Perbandingan demikian lebih disukai untuk diterapkan pada ekstrak tumbuhan langsung, semua protein utama (enzim) tercakup dalam pemeriksaan ini. Menurut Gray (1980) dalam Harbone (1987) pemisahan isoelektrik adalah suatu cara yang didasarkan pada kenyataan bahwa protein mempunyai titik isolistrik yang beragam. Titik isolistrik terjadi karena adanya perbedaan pH. Protein yang dielektroforesis pada suatu larutan pH, masing-masing protein tersebut akan terpusat pada berbagai daerah perbedaan pH tersebut dan karena itu akan terpisah. Penggunaan tegangan tetap pada campuran amfolit pembawa senyawa amfoter dengan titik isoelektrik yang berdekatan dalam polyakrilamide atau gel lain akan menyebabkan terbentuknya perbedaan pH. Suatu protein yang ditempatkan pada sembarang posisi akan memperoleh muatan, jadi akan bergerak sampai mencapai titik isolistriknya. Protein yang titik isolistriknya berbeda 0.1 satuan pH dapat dipisahkan sehingga cara ini mempunyai daya pisah yang tinggi.

2.4 Hipotesis Percobaan

Tanaman jagung yang tercekam logam berat timbal (Pb) akan mengalami perubahan sifat fisiologis sehingga terjadi perubahan kandungan protein sebagai upaya ketahanan tanaman beradaptasi pada kondisi tercekam Pb.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Percobaan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember dan di Green House Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juli 2009 sampai dengan Desember 2009.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah Jagung, 0.5 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 0.05 M Na-EDTA, β -mercaptoethanol, 0.3% SDS, 0.7 M sukrosa, 10% PVP, 25 μ l β -2-mercaptoethanol, TBS (Tris Buffer Saline), 1% Skim Milk (low fat), antibodi PEPC dan Rubisco, 10 ml buffer Alkalin fosfatase.

3.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain mortar-stamper, tabung sentrifuge, spatula, microsentrifuge, Sentrifuge Sorvall tipe RC 5B plus SS-34, endendorf, neraca digital, mikropipet, elektroforesis, spektrofotometer merk Hitachi U-2001, dan *Semi Dry elektro-transblot* (Biorad).

3.3. Pelaksanaan Percobaan

3.3.1. Kondisi Umum Percobaan

Percobaan dimulai dengan mengolah tanah sedemikian rupa sehingga sesuai untuk ditanami jagung. Tanaman jagung yang ditanam adalah jagung hibrida BISI 2 bersertifikat. Persiapan media dilakukan dengan menyaring media tanah agar tanah tidak bercampur dengan batu, plastik dan sampah lainnya. Media tanam dibiarkan selama 7 hari untuk memperoleh tanah dalam kondisi kering angin. Media tanam kemudian dimasukkan dalam timba plastik masing – masing timba berisi 10 Kg tanah kering angin. Dosis pupuk yang digunakan yaitu 300 kg Urea/ha , 100 kg TSP/ha, dan 100 kg KCL/ha. Urea diberikan tiga kali yaitu 1/3

bagian diberikan saat tanam, 1/3 bagian diberikan setelah tanaman berumur 30 hari dan 1/3 bagian diberikan setelah tanaman berumur 45 hari, Sedangkan TSP dan KCL diberikan seluruhnya pada saat tanam. Pupuk diberikan untuk memenuhi kebutuhan hara tanaman sedangkan fungisida diberikan untuk mencegah agar benih yang ditanam tidak dimakan semut atau serangga lain. Pengairan dan penyiangan dilakukan pada saat diperlukan.

Metode pemberian cekaman timbal (Pb) dilakukan dengan menimbang timbal (Pb) menggunakan timbangan digital. Pemberian cekaman timbal dilakukan pada saat umur 26 hari (organ tanaman terbentuk sempurna). Perlakuan Pb menggunakan konsentrasi $P_0 = 0$ ppm, $P_1 = 4$ gr (400 ppm) ; $P_2 = 8$ gr (800 ppm) ; dan $P_3 = 16$ gr (1600 ppm) tiap 10 Kg tanah masing - masing menggunakan 3 ulangan (Ewais, 1997). Pengambilan sampel diperkirakan pada saat tanaman sudah merespon cekaman atau terdapat tanda-tanda morfologis (daun menguning, tinggi tanaman, dll) ± 14 hari setelah perlakuan. Sampel diambil ketika jagung berumur 40 hari dihitung sejak benih ditanam dalam timba. Parameter yang diamati meliputi kandungan protein PEPC, kandungan protein Rubisco, total protein terlarut, kandungan klorofil, berat kering, dan tinggi tanaman.

3.3.2 Cara Ekstraksi Protein

Sampel (1 gram daun) digerus dengan nitrogen cair dalam mortar-stumper dan menambah buffer ekstraksi yang terdiri dari (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M KCl, 0.05 M Na-EDTA, pH 7.4, 2% β -mercaptoethanol, 0.3% SDS, 0.7 M sucrose dan 10% PVP) sehingga volume menjadi tiga kali berat sampel, 20% triptan X-100 ditambahkan dalam larutan. Larutan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil untuk dianalisa.

3.3.3 Penentuan Kandungan PEPC dan Rubisco menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)* dan *Western Blot*

Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) menggunakan metode Laemmli (1970) dengan konsentarsi 10% akrilamide.

Sebanyak 100 μ l sampel protein ditambah buffer loading (475 μ l buffer loading ditambah 25 μ l β -2-mercaptoethanol) kemudian didenaturasi pada air mendidih selama 3 menit. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel sebanyak 10 μ l dan dielektroforesis pada 70 mA selama 2-4 jam.

Analisis Western Blot menggunakan metode Bruneau et al., (1991). Protein dalam gel yang telah selesai dielektroforesis ditransfer ke membran nitroselulosa dengan menggunakan *elektro-transbolt* pada 250 mA selama 2 jam dengan suhu 4 °C. Membran dicuci dengan TBS (*Tris Buffer Saline*) 3 kali selama 5 menit, 1 kali menggunakan TBS (*Tris Buffer Saline*) yang ditambahkan 1% *Skim Milk (low fat)* kemudian diinkubasi semalam dalam antibodi PEPC dan Rubisco (1000 kali pengenceran dalam TBS (*Tris Buffer Saline*) yang ditambahkan 1% *Skim Milk*). Membran dicuci lagi dengan TBS sebanyak 3 kali selama 5 menit. Membran diinkubasi selama 1 jam dalam *Goat anti rabbit IgG AP konjugated (Biorad)* dalam TBS *skim milk*. Kelebihan anti bodi yang ke 2 dicuci dengan menggunakan buffer Alkalin fosfatase pH 9. Pewarnaan menggunakan 25 μ l BCIP dan 50 μ l NBT yang dilarutkan dalam 10 ml buffer Alkalin fosfatase.

3.3.4 Pengukuran Kandungan Klorofil

Satu gram daun digerus dalam mortar, nitrogen cair ditambahkan agar diperoleh ekstrak yang halus. Sampel 40 μ l ditambahkan 960 μ l ethanol pa. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Sampel divortek lalu menginkubasikannya pada suhu 4°C selama 30 menit sampai terdapat endapan. Filtrat diambil sebanyak 1.5 ml dan memasukkannya dalam kuvet. Ekstrak jaringan daun diukur absorbansinya pada panjang gelombang 649 atau 665.

3.3.5 Pengukuran Kandungan Protein Terlarut (μ g/mg sample)

10 μ l supernatan (ekstrak kasar) dimasukan dalam tabung reaksi. Satu ml larutan Bradford ditambahkan dalam tabung reaksi. Supernatan divortek selama 30 detik. Kandungan protein terlarut di deteksi menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 545 dengan bovine serum albumin sebagai standart.

3.3.6 Parameter Percobaan

Parameter percobaan diambil berdasarkan pendekatan – pendekatan dari sifat fisiologis utama yang mempengaruhi morfologi tanaman jagung, antara lain :

1. Kandungan total protein terlarut. Pengukuran kandungan protein menggunakan metode Bradford dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 649 λ dan 665 λ .
2. Kandungan klorofil. Pengukuran kandungan klorofil menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 649 λ dan 665 λ . Rumus menghitung kandungan klorofil a = $(13.7 \times A_{665}) - (5,76 \times A_{649}) = \mu\text{g}$ klorofil/ml, sedangkan klorofil b = $(25.8 \times A_{649}) - (7.60 \times A_{665}) = \mu\text{g}$ klorofil/ml. Total klorofil menggunakan rumus = klorofil a + klorofil b.
3. Kandungan protein PEPC dan protein Rubisco. Analisis menggunakan metode Laemmli (*Elektroforesis*) dan metode Bruneau (*Semi Dry elektro-transblot - Biorad*).
4. Tinggi tanaman (cm), diukur dari pangkal batang sampai dengan tangkai malai.
5. Berat kering tanaman (gram), diukur dengan menimbang seluruh bagian tanaman yang telah dikeringkan terlebih dahulu dengan menggunakan oven selama 48 jam dengan suhu 70 °C – 80 °C.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Perubahan Morfologi Tanaman Jagung Tercekam Pb

Tanaman jagung merupakan salah satu tanaman pangan yang termasuk tanaman semusim, kelompok tanaman C4, memiliki dua enzim yang berperan dalam proses fotosintesis (PEPC dan Rubisco), dan memiliki bentuk morfologi daun seperti pedang. Sifat fisiologis yang berbeda dengan tanaman kelompok lainnya (C3 dan CAM) menyebabkan tanaman jagung memiliki kelebihan, terutama dalam proses fotosintesis yaitu: keunggulan tanaman jagung dalam memanfaatkan CO₂ dari udara yang diserap secara efisien dan dapat menghasilkan fotoasimilat yang tinggi karena peran kedua enzim tersebut (Anderson and Beardall, 1991).

Tanaman jagung yang mengalami cekaman Pb menunjukkan perbedaan tinggi tanaman dan warna batang bagian bawah (Gambar 1).



a. Tinggi tanaman

b. Perbedaan Morfologi Batang

Gambar 1. Perbedaan morfologi tanaman jagung pada kondisi cekaman Pb pada umur 40 hari setelah tanam.

Cekaman timbal (Pb) tidak mempengaruhi tinggi tanaman jagung, Hal ini membuktikan bahwa tanaman jagung tahan dalam kondisi timbal tinggi seperti yang dilaporkan oleh Miller dan Koepe (1971) bahwa jagung (*Zea Mays L*) adalah tanaman yang dapat memindahkan dan mengumpulkan Pb dalam jumlah yang signifikan dalam daun. Cekaman timbal (Pb) menyebabkan kerusakan dan

perubahan fisiologi tanaman yang kemudian diekspresikan dalam gangguan pertumbuhan. Koslowski dan Mudd (1975) menyebutkan bahwa cekaman timbal dapat menyebabkan terjadinya kerusakan fisiologis didalam tanaman jauh sebelum terjadinya kerusakan fisik (morfologi). Hal tersebut sebagai kerusakan tersembunyi. Kerusakan tersembunyi dapat berupa penurunan kemampuan tanaman dalam menyerap air, pertumbuhan sel yang lambat atau pembukaan stomata yang tidak sempurna.

4.2 Pengaruh Cekaman Timbal terhadap Fisiologi Tanaman

4.2.1 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Kandungan PEPC

PEPC merupakan enzim utama yang berperan dalam proses fotosintesis tanaman, sehingga kandungan PEPC yang lebih tinggi di daun dapat mempengaruhi laju fotosintesis tanaman. Dari hasil analisis *western blot* terhadap PEPC menggunakan antibody spesifik yang hanya berikatan dengan antigen PEPC menunjukkan bahwa meningkatnya pemberian timbal (Pb) ke dalam tanah mempengaruhi kandungan PEPC di daun. Kandungan PEPC pada perlakuan cekaman timbal (Pb) ditunjukkan oleh Gambar 2.



Gambar 2. Analisa *Western Blot* enzim PEPC daun jagung pada perlakuan cekaman timbal (Pb).

Hasil analisis *western blot* terhadap PEPC menghasilkan gambar blot. Gambar 2 diatas menunjukkan hasil perbedaan kandungan PEPC. Tabel 1 menunjukkan blot yang dikuantitatifkan menggunakan program Beta 4.0.3 of *Scion Image for Windows*.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Luas Area Blot dengan Menggunakan Beta 4.0.3 of Scion Image for Windows

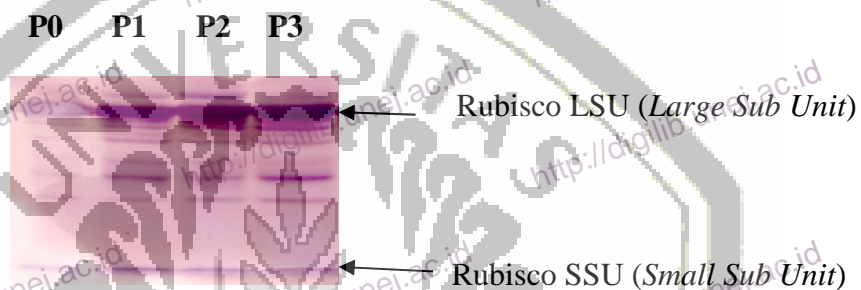
No	Perlakuan	Luas Area Blot (cm ²)	Kepadatan Blot
1	P ₀	0.1	52.25
2	P ₁	0.11	61.4
3	P ₂	0.13	66.56
4	P ₃	0.14	69.24

Jumlah enzim PEPC yang meningkat pada jagung dengan perlakuan timbal 400 ppm, 800 ppm dan 1600 ppm mengakibatkan peningkatan laju fotosintesis yang lebih tinggi daripada kontrol, seperti tampak pada tabel 1. Peningkatan luas blot enzim PEPC pada konsentrasi 400 ppm, 800 ppm dan 1600 ppm masing-masing mencapai 0.11 cm², 0.13 cm² dan 0.14 cm² dari kontrol. Semakin tebal pita protein pada membran maka kandungan enzim PEPC semakin tinggi, dan sebaliknya apabila pita protein semakin tipis maka kandungan protein kecil. Pemberian Pb menyebabkan semakin meningkatkan kandungan PEPC di mesofil sel yang mempengaruhi laju fotosintesis di dalam daun. Peningkatan PEPC menyebabkan semakin tingginya laju fotosintesis karena PEP mempunyai peran yang sangat penting dalam asimilasi karbon pada tanaman C₄. Ketebalan pola yang terbentuk mulai dari P₀ sampai P₃ mengalami peningkatan, tanaman jagung merespon cekaman Pb dengan meningkatkan kandungan PEPC dengan harapan bahwa proses fotosintesis dapat dipertahankan dan mampu mengatasi kondisi yang tercekam. Clijsters dan Van Assche (1985) menyatakan bahwa kontaminasi logam berat mendorong perubahan dalam metabolisme dasar tumbuhan. Fotosintesis adalah salah satu proses fisiologis utama yang dikenal sangat terpengaruh oleh stres logam berat.

4.2.2 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Kandungan Rubisco

Enzim fotosintetik memegang peranan yang sangat penting di dalam proses fotosintesis pada tanaman tingkat tinggi. Fotosintesis yang diregulasi oleh cahaya adalah suatu fenomena yang kompleks, berpusat pada aktivitas enzim

ribulosa bifosfat karboksilase/ oksigenase (Rubisco) yang merupakan enzim utama untuk fiksasi karbon. Enzim Rubisco telah menjadi subyek penting untuk diteliti karena fungsi kontrolnya yang tinggi terhadap fotosintesis pada berbagai kondisi cahaya (Sage dan Hudson, 1992). Untuk melihat kandungan rubisco yang terinduksi selama cekaman timbal (Pb) dilakukan analisis western blot menggunakan antibody spesifik yang hanya berikatan dengan antigen rubisco sehingga enzim rubisco yang mampu terdeteksi. Gambar 3 memperlihatkan hasil analisis kandungan rubisco contoh daun kontrol dan tercekam timbal (Pb).



Gambar 3. Analisa *Western Blot* enzim Rubisco daun jagung pada perlakuan cekaman timbal (Pb).

Hasil analisis *western blot* terhadap Rubisco menghasilkan gambar blot. Gambar 3 diatas menunjukkan hasil perbedaan kandungan Rubisco. Tabel 1 menunjukkan blot yang dikuantitatifkan menggunakan program Beta 4.0.3 of *Scion Image for Windows*.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Luas Area Blot dengan Menggunakan Beta 4.0.3 of *Scion Image for Windows*

No	Perlakuan	Luas Area Blot (cm ²)	Kepadatan Blot
1	P ₀	0.06	94
2	P ₁	0.48	123.99
3	P ₂	0.68	124.35
4	P ₃	0.96	127.41

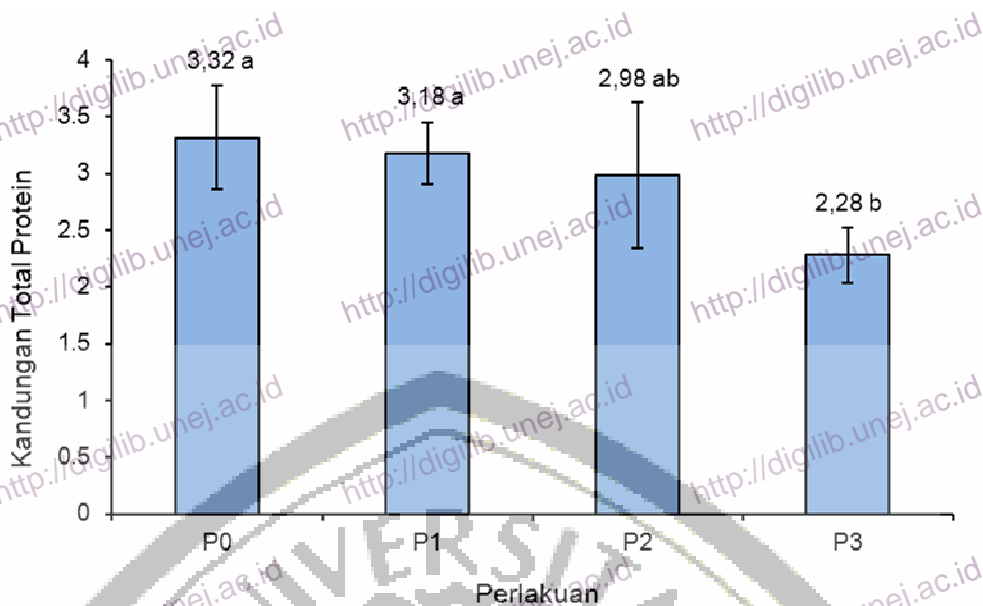
Jumlah enzim Rubisco yang meningkat pada jagung dengan perlakuan timbal 400 ppm, 800 ppm dan 1600 ppm mengakibatkan peningkatan laju fotosintesis yang lebih tinggi daripada kontrol, seperti tampak pada tabel 1.

Peningkatan luas blot enzim PEPC pada konsentrasi 400 ppm, 800 ppm dan 1600 ppm masing-masing mencapai 0.48 cm², 0.68 cm² dan 0.96 cm² dari control. Ketebalan pita protein (kandungan rubisco) mengalami peningkatan. Hal ini menunjukkan adanya upaya dari tanaman beradaptasi pada kondisi Pb yang tinggi dengan meningkatkan sintesis protein rubisco. Tanaman yang tumbuh pada kondisi lingkungan kurang menguntungkan akan membentuk pola pertahanan untuk beradaptasi dengan menambah sintesis asam amino tertentu dan mengurangi sintesis protein lain bahkan meningkatkan produksi enzim tertentu.

Pemberian Pb pada tanaman jagung menyebabkan meningkatnya kandungan rubisco yang merupakan enzim fotosintesis pada tanaman jagung. Rubisco merupakan enzim yang berperan penting dalam siklus calvin yang berada di *Bundle Sheat Cell* pada tanaman jagung. Rubisco memegang peranan penting dalam fotosintesis, yaitu yang mengikat CO dan ribulosa 1.5 bifosfat (RuBP) dalam siklus Calvin yang menghasilkan 3-PGA. Peningkatan kandungan Rubisco yang di tandai dengan semakin tebalnya pita protein pada analisa western blot menyebabkan peningkatan laju fotosintesis (Portis, 1992).

4.2.3 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Kandungan Total Protein Terlarut

Logam berat dalam tanah pada prinsipnya berada dalam bentuk bebas (mobil) maupun tidak bebas (immobil). Dalam keadaan bebas, logam berat yang bersifat bebas menyebabkan keracunan apabila diserap oleh tanaman. Dalam kondisi tidak bebas tanaman menjadi tercekam oleh unsur logam tersebut. Dapat berikatan dengan hara lain, bahan organik, dan anorganik. Logam berat dalam kondisi bebas mempengaruhi ketersediaan hara tanaman dan dapat mengkontaminasi lingkungan sehingga dalam tanah menyebabkan tanaman menjadi tercekam oleh unsur logam tersebut, di dalam tanah dalam keadaan tersedia mengakibatkan terjadi ketidakseimbangan unsur dalam tanah sehingga terserap oleh tanaman melalui akar, dan terdistribusi ke bagian organ lain. Tanaman jagung yang mengalami cekaman Pb menunjukkan perbedaan kandungan total protein (Gambar 4).



Gambar 4. Kandungan Total Protein

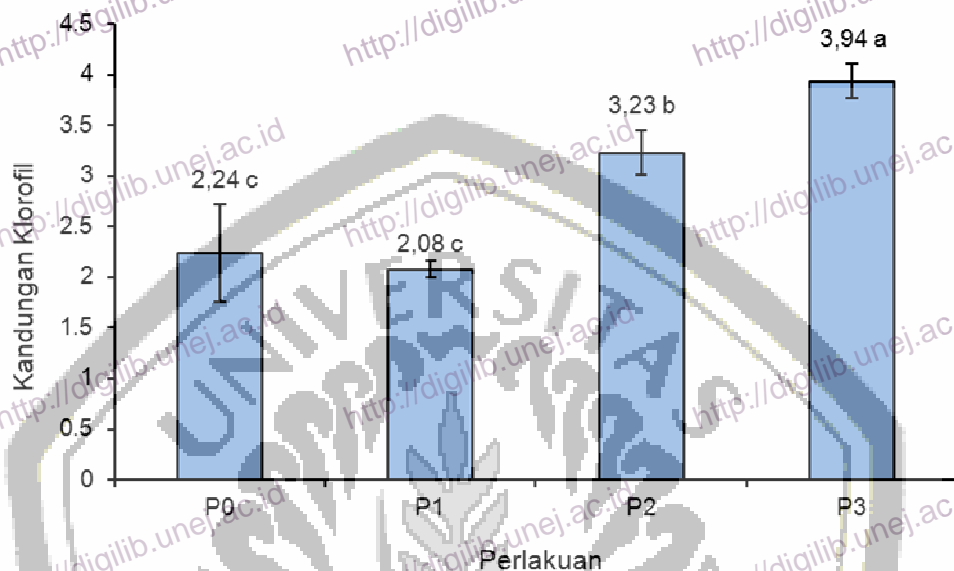
Kandungan protein yang cenderung mengalami penurunan merupakan pengaruh kurang baik terhadap pembentukan protein, yang ditandai semakin meningkatnya pemberian Pb maka rata-rata kandungan total protein terlarut semakin menurun.

Total protein terlarut tidak berhubungan dengan tingkat pertumbuhan tanaman karena protein terlarut diasumsikan sebagai protein enzim sedangkan di dalamnya bukan hanya protein enzim yang berasal dari PEPC, Rubisco tetapi juga enzim – enzim lain yang berperan dalam proses asimilasi karbon, sehingga wajar apabila total protein terlarut mengalami penurunan dan kenaikan pada setiap perlakuan.

4.2.4 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Kandungan Klorofil

Peningkatan kandungan klorofil a dan b menyebabkan kemampuan dalam menangkap energi radiasi cahaya. Klorofil a dan b berperan dalam proses fotosintesis tanaman. Klorofil b berfungsi sebagai antena fotosintetik yang mengumpulkan cahaya. Peningkatan kandungan klorofil b berkaitan dengan peningkatan protein klorofil sehingga akan meningkatkan efisiensi fungsi fotosintetik. Klorofil b berfungsi sebagai antena yang mengumpulkan cahaya

untuk kemudian ditransfer ke pusat reaksi. Pusat reaksi tersusun dari klorofil a. Energi cahaya akan diubah menjadi energi kimia di pusat reaksi yang kemudian dapat digunakan untuk proses reduksi dalam fotosintesis. Tanaman jagung yang mengalami cekaman Pb menunjukkan perbedaan kandungan klorofil (Gambar 5).



Gambar 5. Kandungan Total Klorofil

Perlakuan pemberian Pb 4 gr, 8 gr dan 16 gram memberikan pengaruh terhadap kandungan klorofil yang ditunjukkan dengan kecenderungan meningkatnya kandungan klorofil pada setiap tanaman. Semakin banyak perlakuan Pb yang diberikan ternyata memberikan pengaruh yang baik terhadap kandungan klorofil. Kandungan klorofil yang semakin meningkat menunjukkan upaya tanaman untuk beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang kurang baik dengan semakin meningkatkan kandungan klorofilnya untuk mempertahankan keberlangsungan proses fotosintesis. Dixon dan Paiva (1995) menyatakan bahwa pada dasarnya ada dua macam strategi tumbuhan untuk dapat mengatasi suatu cekaman, yaitu pertama dengan memperbaiki kerusakan yang ditimbulkan, dan yang kedua dengan melalui mekanisme pertahanan dengan mengakumulasi senyawa proteksi. Kedua strategi dapat bekerja secara bersamaan, dan saling melengkapi. Misalnya saja senyawa isoflavonoid pada *Arabidopsis* yang biosintesisnya ditujukan untuk melindungi dari kerusakan dan kematian sel

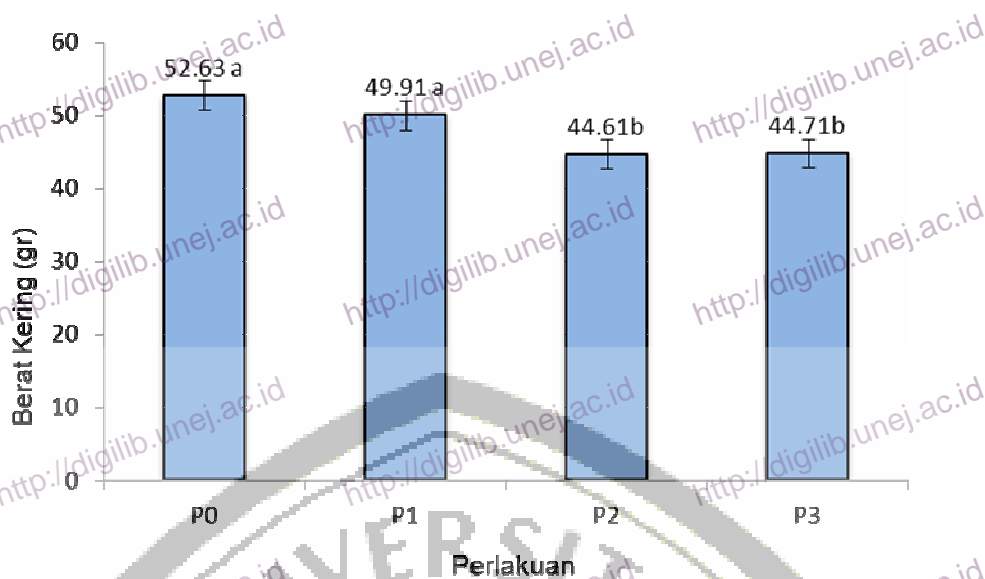
dengan mencegah dimerisasi pada DNA. Biosintesis isoflavonoid tersebut dipicu oleh cekaman UV-B.

Peningkatan kandungan klorofil mengakibatkan peningkatan laju proses fotosintesis sehingga hasil proses fotosintesis juga meningkat. Perubahan kandungan klorofil akibat meningkatnya konsentrasi Pb terkait dengan struktur kloroplas. Pembentukan struktur kloroplas sangat dipengaruhi oleh nutrisi mineral seperti Mg dan Fe. Masuknya logam berat secara berlebihan pada tumbuhan, misalnya logam berat Pb akan menambah asupan Mg dan Fe sehingga menyebabkan perubahan pada volume dan jumlah kloroplas. (Kovacs, 1992).

Kandungan klorofil berkorelasi positif dengan kandungan nitrogen daun, sehingga dapat dijadikan indikator laju fotosintesis (Sampson et al., 2003; Fracheboud, 2006). Menurut Sampson (2003) dan Fracheboud (2006), kadar klorofil dapat dijadikan indikator yang sensitif kondisi fisiologis suatu tumbuhan, karena kandungan klorofil berkorelasi positif dengan kandungan nitrogen daun, sehingga dapat dijadikan indikator laju fotosintesis.

4.3 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Berat Kering Tanaman

Pertumbuhan merupakan pertambahan dalam bahan. Berat kering merupakan ukuran yang telah diterima secara umum, baik dari tanaman seluruhnya atau bagian – bagianya. Berat basah atau berat segar suatu tanaman mengalami perubahan besar dalam status airnya dalam waktu tertentu, dapat berubah – ubah dalam waktu sehari. Berat kering lebih baik daripada berat segar, karena paling sedikit 90 % bahan kering tanaman adalah hasil fotosintesis. Analisis pertumbuhan dinyatakan dengan berat kering untuk mengukur kemampuan tanaman sebagai penghasil fotosintat. Tanaman jagung yang mengalami cekaman timbal menunjukkan perbedaan berat kering (Gambar 6).

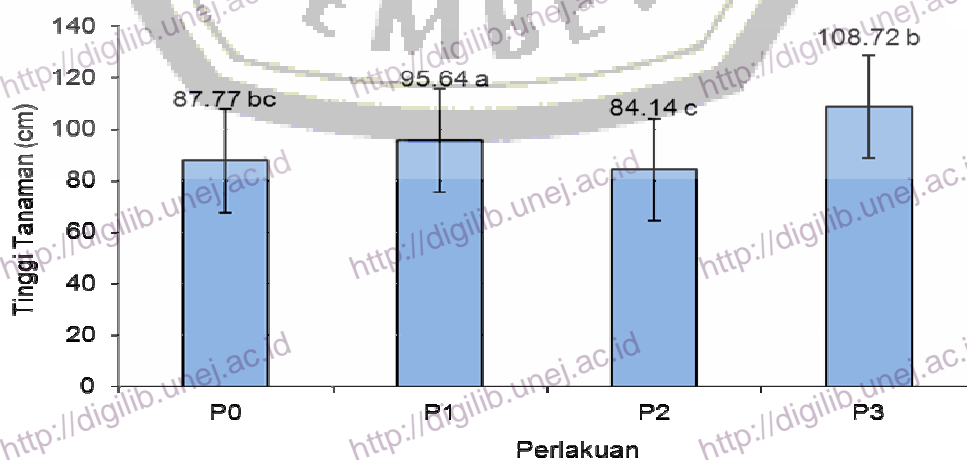


Gambar 6. Berat Kering Tanaman

Berat kering tanaman merupakan respon dari kemampuan tanaman dalam menangkap energi pada proses fotosintesis. Semakin menurun berat kering tanaman menunjukkan bahwa proses fotosintesis berjalan kurang baik sehingga pertumbuhan tanaman kurang optimal. Fenomena ini menunjukkan bahwa berat kering sangat dipengaruhi fiksasi CO_2 yang diambil secara acak dan secara kebetulan oleh tanaman. Gardner (1991) menyatakan bahwa berat kering total merupakan akibat dari penimbunan hasil bersih asimilasi CO_2 sepanjang musim pertumbuhan, karena asimilasi CO_2 merupakan hasil penyerapan energi matahari dan akibat radiasi matahari, berdasarkan keadaan musiman didistribusikan secara merata ke seluruh permukaan bumi. Maka faktor utama yang mempengaruhi berat kering total hasil panen adalah radiasi matahari yang diabsorpsi dan fiksasi CO_2 secara acak. Kontaminasi Pb dalam tanah tidak hanya menimbulkan perubahan aktivitas mikroorganisme tanah dan mengakibatkan penurunan kesuburan tanah tetapi juga langsung mempengaruhi perubahan indeks fisiologis dan, lebih jauh lagi, mengakibatkan penurunan hasil (Majer, 2002).

4.4 Pengaruh Cekaman Timbal (Pb) terhadap Tinggi Tanaman

Pertumbuhan tanaman sering didefinisikan sebagai pertambahan ukuran, berat atau jumlah sel. Ukuran tanaman sebagai indikator dapat dilihat secara satu dimensi (misalnya dengan mengukur tinggi tanaman), dua dimensi (misalnya dengan mengukur total luas permukaan daun), atau tiga dimensi (misalnya dengan mengukur volume akar). Selama pertumbuhan dan perkembangannya tanaman akan membentuk bermacam-macam organ. Secara umum organ tanaman terdiri dari organ vegetatif dan organ generatif. Akar, batang dan daun dikelompokkan sebagai organ vegetatif. Sedangkan bunga buah dan biji digolongkan sebagai organ generatif. Organ vegetatif akan terbentuk lebih awal dibanding organ generatif. Fase dimana tanaman hanya membentuk organ vegetatif dinamakan fase *pertumbuhan vegetatif*. Pertumbuhan vegetatif dicirikan dengan berbagai aktifitas pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang berhubungan dengan pembentukan meristem apikal atau lateral dan terbentuk menjadi batang dan cabang, ekspansi sistem perakaran, dan pembesaran daun (Lakitan, 1996). Penemuan lintasan fotosintesis C₄ (Hatch, 1970) menerangkan bahwa daun – daun jagung mempunyai laju fotosintesis yang tinggi, tingkat kompensasi CO₂ yang rendah, dan tidak jenuh cahaya untuk fotosintesis sekalipun dalam cahaya matahari penuh (Hesketh, 1962). Tanaman jagung yang mengalami cekaman Pb menunjukkan perbedaan tinggi tanaman (Gambar 7).



Gambar 7. Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman merupakan salah satu cerminan yang membuktikan bahwa tanaman mampu tumbuh dengan baik pada kondisi lingkungan tercekam. Tinggi tanaman menggambarkan terjadinya proses pertumbuhan di daerah meristematik, ujung dan apikal. Peningkatan tinggi tanaman jagung ini berarti akan meningkatkan pula jumlah daun yang terbentuk atau berat segar biomassa. Tinggi tanaman merupakan ukuran tanaman yang sering diamati baik sebagai indikator pertumbuhan maupun sebagai parameter yang digunakan untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan (Sitompul, 1995).



BAB 5. SIMPULAN DAN SARAN

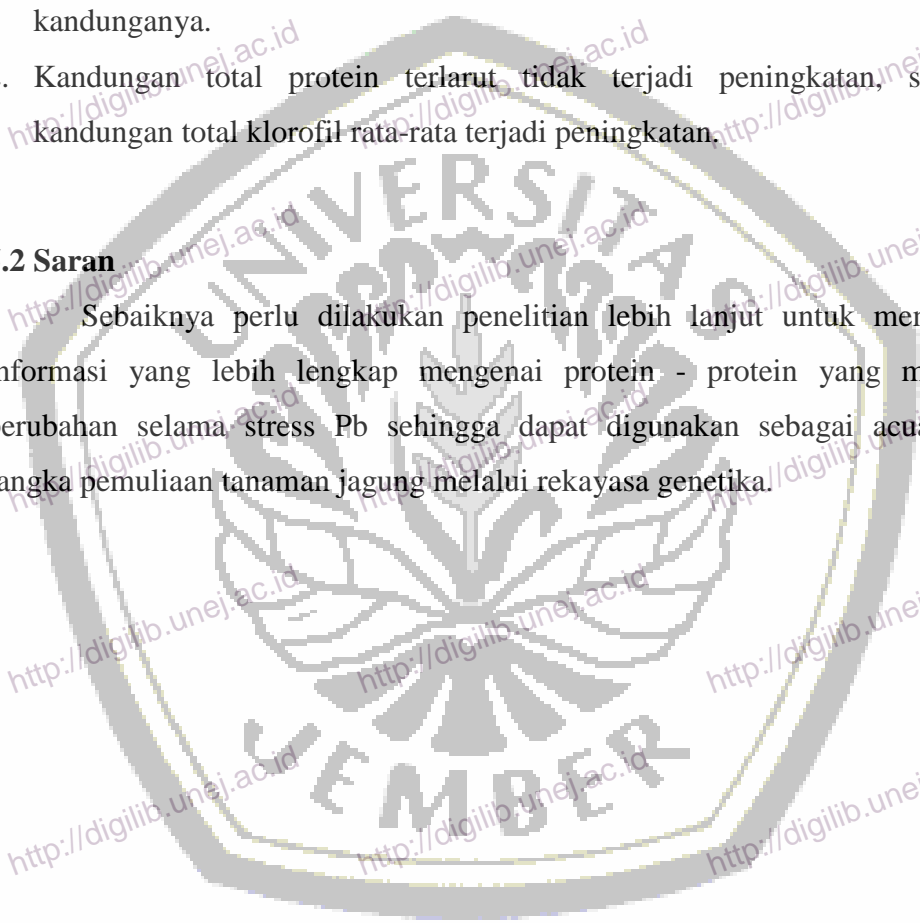
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Perlakuan Cekaman Pb mempengaruhi sifat fisiologi tanaman jagung terutama kandungan PEPC dan Rubisco yang semakin meningkat kandungannya.
2. Kandungan total protein terlarut tidak terjadi peningkatan, sedangkan kandungan total klorofil rata-rata terjadi peningkatan.

5.2 Saran

Sebaiknya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan informasi yang lebih lengkap mengenai protein - protein yang mengalami perubahan selama stress Pb sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam rangka pemuliaan tanaman jagung melalui rekayasa genetika.



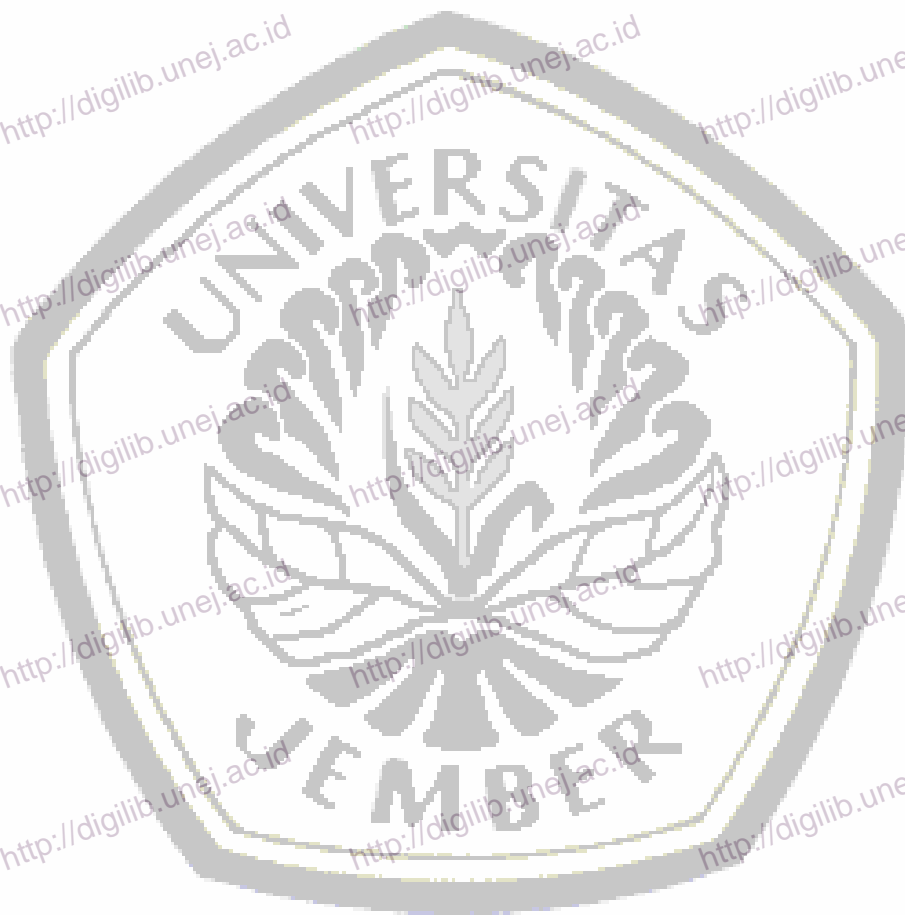
DAFTAR PUSTAKA

- Alloway, B.J.1995. *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. Hal 39-57, 206-223.
- Anderson, J. W and J. Beardall. 1991. *Molecular Activities of Plant Cells*. Blackwell Scientist Publication. Melbourne.
- Antosiewicz.1992. *Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals*. Acta Soc. Bot. Polon. 61:281-299.
- Asthan. 1990. *Enzyme of C4 Photosynthesis, methods in Plants Biochemistry*. Academic Press Limited. Cambera City Australia.
- Berichte.1974. *The Effect Of Heavy Metals On Plants: Part I*. Inhibition of gas exchange in sunflower by Pb, Cd, Ni and Ti. Environ.Pollu. 7, 241 – 246
- Cellier F. G. Conejero, J. C. Breitler, F. Casse. 1998. *Moleculer and Physiological Responses to Water Deficit International Drough – Tolerance and Drough – Sensitive Lines of SunFlower*. Plant Physiol 116: 319-328.
- Chaney R. L., Ryan J. A.1994. *Risk based standards for arsenic lead and cadmium in urban soils*. Dechema, Frankfurt, Germany.
- Connel, Des. W dan Gregory J. Miller. 1995. *Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran*. UI Press. Jakarta
- Darmono. 1995. *Logam dalam Sistem Biologi*. UI Press.
- Eick MJ, Peak JD, Brady PV, Pesek JD.1999. *Kinetics of lead adsorption and desorption on goethite: Residence time effect*. Soil. Sci. 164:28–39.
- Franklin P. Gardner, R. Brent Pearce, and Rogert, Mitcheli. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Terjemahan Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Hatch, M. D. 1970. *Photosynthetic CO2 – Fixation Pathways*. Plant Physiol. 141 - 162.
- Ewais. E. A . 1997. *Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds*. Biol. Plant. 39:403-410.
- Godzik B.1993. *Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area*. Pol. Bot. Stud. 5:113-132.

- Goldsworthy, P. R. 1974. *Maize Physiology*. CIMMYT. Mexico.
- Hanafiah, KA. 2005. *Biologi Tanah*. PT.Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Hatch M. D. dan Oliver. 1978. *Austral Plant Physiol.* 4. 207 – 216
- Hestketh, J.D dan R. B. Musgrave. 1962. *Photosynthesis Under Field Conditions. Light Studies with Individual Corn Leaves*. Crop Sci. 311-315.
- Kurnia, U, Kurniawansyah, AM, Sukristiyonubowo, dan Subowo. 1999. *Pengaruh Logam Berat Pb dalam Tanah terhadap Kandungan Pb, Pertumbuhan dan hasil tanam Caisem (Brassica rapa)*. Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Tanah, Iklim dan Pupuk. Puslittanak, Bogor.
- Kurniawansyah. 1999. *Pengaruh Logam Berat Pb dalam Tanah terhadap Kandungan Pb, Pertumbuhan dan hasil tanam Caisem (Brassica rapa)*. Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Tanah, Iklim dan Pupuk. Puslittanak. Bogor.
- Kovacs, M. 1992. *Biological Indicators in Environmental Protection*. Market Cross House.
- Kozlowski, T. T. P. J. Kramer. S. G. Pallardy. 1991. *The Physiological Ecology of Woody Plants*. Academic Press Inc. London.
- Lane SD, Martin ES. 1977. *A histochemical investigation of lead uptake in Raphanus sativus*. New Phytol. 79:281-286.
- Manahan, S.E. 1977. *Environmental Chemistry*. Longman Chesire, London.
- Majer, BJ, Tscherko, D., Paschke, A., 2002. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mut. Res. Res.* 515, 111-124.
- Mengel K, dan E.A. Kirby. 1987. *Principles of Plant Nutrition*. International Potash Institute. New York.
- Mukono J., Koeswadji H., Sugijanto, Laksmiawati E. (1991). Laporan Penelitian: Status Kesehatan dan Kadar Pb (timah hitam) Darah pada Karyawan SPBU di Jawa Timur. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Paivoke. 2002. *Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of Pisum sativum*. *Environ. Exp. Bot.* 48:61-73.

- Patra, M., N. Bhowmik, B. Bandopadhyay dan A. Sharma. 2004. *Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic arsenic tolerance*. *Environ. toleransi. Lingkungan. Exp. Exp. Bot.*, 52: 199-223. *Bot.*, 52: 199-223.
- Portis, AR. 1992. *Regulation of ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/ oxygenase activity*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:415-437.
- Purbayanti, E. D. 1994. *Fisiologi Lingkungan Tanaman*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Salisbury, F. B. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. ITB Press. Bandung.
- Sitompul, SM. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sumarni. 1996. *Efisiensi Pemupukan NPK pada Sistem Tanam Bawang Merah dan Cabai*. Prosiding Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Jakarta.
- Smith, J. 1981. *Air Pollution and Plant Life*. John Willey & Sons Ltd. Chichester, New York.
- Subowo, Mulyadi, S. Widodo, dan Asep Nugraha. 1999. *Status dan Penyebaran Pb, Cd, dan Pestisida pada Lahan Sawah Intensifikasi di Pinggir Jalan Raya*. Prosiding. Bidang Kimia dan Bioteknologi Tanah, Puslittanak, Bogor.
- Sudarmaji. 2006. Toksikologi logam berat bahan berbahaya dan beracun (B3) dan dampaknya. *Jurnal Keshling*. Volume 2 no. 2
- Sutamiharja. 1985. *Ilmu Lingkungan*. ITB Press. Bandung.
- Soedharoedjian. 1996. *Fisiologi Tanaman Budidaya Tropik*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Yang Y, Jung J-Y, Song W-Y, Suh HS, Lee Y. 2000. *Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance*. *Plant Physiol*. 124:1019-1026.
- Taiz, L. dan E.Zieger. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Inc. Publisher, Massachussets.
- Treshow, et al. 1989. *Plant Stress from Air Pollution*. Ltd. Chichester. New York.

Viestra, R. D. 1993. *Protein Degradation in Plants*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 385-410.

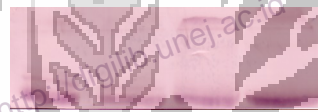


LAMPIRAN

lampiran 1. ANALISA WESTERN BLOT ENZIM RUBISCO



lampiran 2. ANALISA WESTERN BLOT ENZIM PEPC



lampiran 3. Pengukuran Luas Area Blot dengan Menggunakan Beta 4.0.3 of Scion Image for Windows

Langkah – langkah dalam mengukur gambar menggunakan program Scion Image adalah berikut :

1. Pengambilan Objek Gambar :

Objek gambar yang akan diukur merupakan hasil analisa western blot protein PEPC dan Rubisco.

2. Perubahan Format Objek Gambar

Gambar yang telah diambil kemudian dirubah dalam format gambar TIFF (Tag Image File Format) atau BMP (Windows Bitmap). Untuk merubah format dapat menggunakan program Photoshop atau program ACDsee yang dimiliki oleh Windows.

3. Pengukuran pada Scion Image terdiri atas LUT, Tools Box, Info Box, Map, dan Tools Bar.

Hal pertama yang dilakukan untuk memulai pengukuran pada program Scion Image adalah membuka gambar yang akan diukur. File dapat diambil dengan klik File kemudian Open (CTRL+O). Kemudian gambar dapat diambil pada folder gambar tersebut disimpan.



Gambar 8. Tampilan Objek dan Skala pada Scion Image

Untuk mengakuratkan pengukuran, objek gambar diperlukan kalibrasi menggunakan sebuah skala. Kalibrasi ini menggunakan tool straight line yang dapat ditemukan pada box tools. Garis ini digambar pada objek yang akan diukur sama panjangnya dengan skala perbesaran.

Langkah berikutnya adalah menganalisis garis yang telah digambar sesuai pengukuran yang diinginkan (misal dalam centimeter). Langkah ini dapat dilakukan dengan meng-klik menu Analyze kemudian pilih Set Scale.



Gambar 9. Tampilan Menu Set Scale

Langkah selanjutnya mengganti box Units dengan satuan centimeter atau sesuai dengan satuan dalam skala yang digunakan. Apabila skala yang dipakai adalah 1 cm, maka pada box Known Distance diisi dengan mengetikkan angka 1.00. Setelah selesai klik tombol OK atau tekan Enter.

Sebelum dilakukan pengukuran objek dirubah dalam format grayscale dengan meng-klik menu Option kemudian Threshold. Pengukuran luas area Blot dilakukan dengan menggunakan tool Magic Stick, kemudian klik kursor pada objek yang akan diukur. Untuk mengetahui nilai pengukuran dengan meng-klik menu Analyze dan memilih Measure, atau dengan menekan tombol CTRL+1. Luas area dari hasil pengukuran objek dapat dilihat pada box Info. Hasil pengukuran juga dapat dilihat dengan memilih menu Show Result pada menu Analyze, atau menekan tombol CTRL+2.

lampiran 4. Kandungan Klorofil

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
P0	1.78	2.74	2.20	6.72	2.240
P1	2.12	1.99	2.13	6.24	2.080
P2	2.98	3.29	3.41	9.68	3.227
P3	3.97	4.09	3.75	11.81	3.937
Jumlah	10.85	12.11	11.49	34.45	
Rata-rata	2.713	3.028	2.873		2.871

Sidik Ragam

Sumber Keragaman	dB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-hitung	F-tabel		
					5%	1%	
Perlakuan	3	6.858	2.286	28.876	**	4.07	7.59
Galat	8	0.633	0.079				
Total	11	7.491					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
cv = 9.80%

Uji Beda Jarak Berganda Duncan

Parameter : Kandungan Klorofil

KT Galat = 0.0791667

dB Galat = 8

SD = 0.1624466

Perlakuan	P1	P0	P2	P3
Rata-rata	2.080	2.240	3.227	3.937
p		2.000	3.000	4.000
SSR 5%		3.260	3.390	3.470
DMRT 5%		0.530	0.551	0.564
Beda rata-rata				
P1		0.160	1.147	1.857
P0			0.987	1.697
P2				0.710
Notasi	c	c	b	a

Tabel Uji Beda Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Rata-rata	Rank	SSR 5%	DMRT 5%	Notasi
P3	3.937	1	3.470	0.564	a
P2	3.227	2	3.390	0.551	b
P0	2.240	3	3.260	0.530	c
P1	2.080	4			c

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada Uji Duncan taraf 5%.

Lampiran 5. Kandungan Total Protein

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
P0	3.78	3.30	2.87	9.95	3.317
P1	3.38	2.87	3.29	9.54	3.180
P2	2.24	3.38	3.33	8.95	2.983
P3	2.38	2.01	2.46	6.85	2.283
Jumlah	11.78	11.56	11.95	35.29	
Rata-rata	2.945	2.890	2.988		2.941

Sidik Ragam Kandungan Protein

Sumber Keragaman	dB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-hitung	F-tabel	
					5%	1%
Perlakuan	3	1.898	0.633	3.356 ns	4.07	7.59
Galat	8	1.508	0.188			
Total	11	3.406				

Keterangan :
 ns = Tidak berbeda nyata
 cv = 14.76%

Uji Beda Jarak Berganda Duncan

Parameter : Kandungan Protein

KT Galat = 0.1885
 dB Galat = 8
 SD = 0.2506658

Perlakuan	P3	P2	P1	P0
Rata-rata	2.283	2.983	3.180	3.317
p		2.000	3.000	4.000
SSR 5%		3.260	3.390	3.470
DMRT 5%		0.817	0.850	0.870
Beda rata-rata				
P3		0.700	0.897	1.033
P2			0.197	0.333
P1				0.137
Notasi	b	ab	a	a

Tabel Uji Beda Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Rata-rata	Rank	SSR 5%	DMRT 5%	Notasi
P0	3.317	1	3.470	0.870	a
P1	3.180	2	3.390	0.850	a
P2	2.983	3	3.260	0.817	ab
P3	2.283	4			b

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada Uji Duncan taraf 5%.