



**PENGARUH SAAT PEMBERIAN SULFUR TERHADAP  
DINAMIKA KANDUNGAN PROTEIN DAN KLOOROFIL  
DAUN KEDELAI (*Glicine max* L. Merrill) PADA  
FASE PERTUMBUHAN VEGETATIF**

**KARYA ILMIAH TERTULIS  
(SKRIPSI)**

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk  
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu  
Pada Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian  
Universitas Jember

Oleh

**FEBTI SURYANI**  
**NIM: 9415101130**

No. Induk	0 3 NOV 2000	KLAS
Tanggal		S
		633.3
		94R
No. Induk	1083031/2000	p e-17

Diterima Oleh :

**Fakultas Pertanian Universitas Jember**

sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan pada

Hari : Kamis

Tanggal : 26 Oktober 2000

Tempat : Fakultas Pertanian

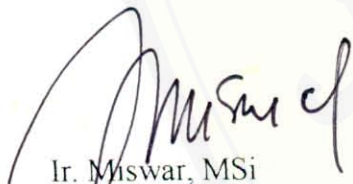
Tim Penguji

Ketua,




Ir. Soegeng Prasetyo Kasno, MS  
NIP.130 516 234

Anggota I



Ir. Miswar, MSi  
NIP. 131 880 473

Anggota II



Dr. Ir. Ketut Anom Wijaya  
NIP. 131 474 910

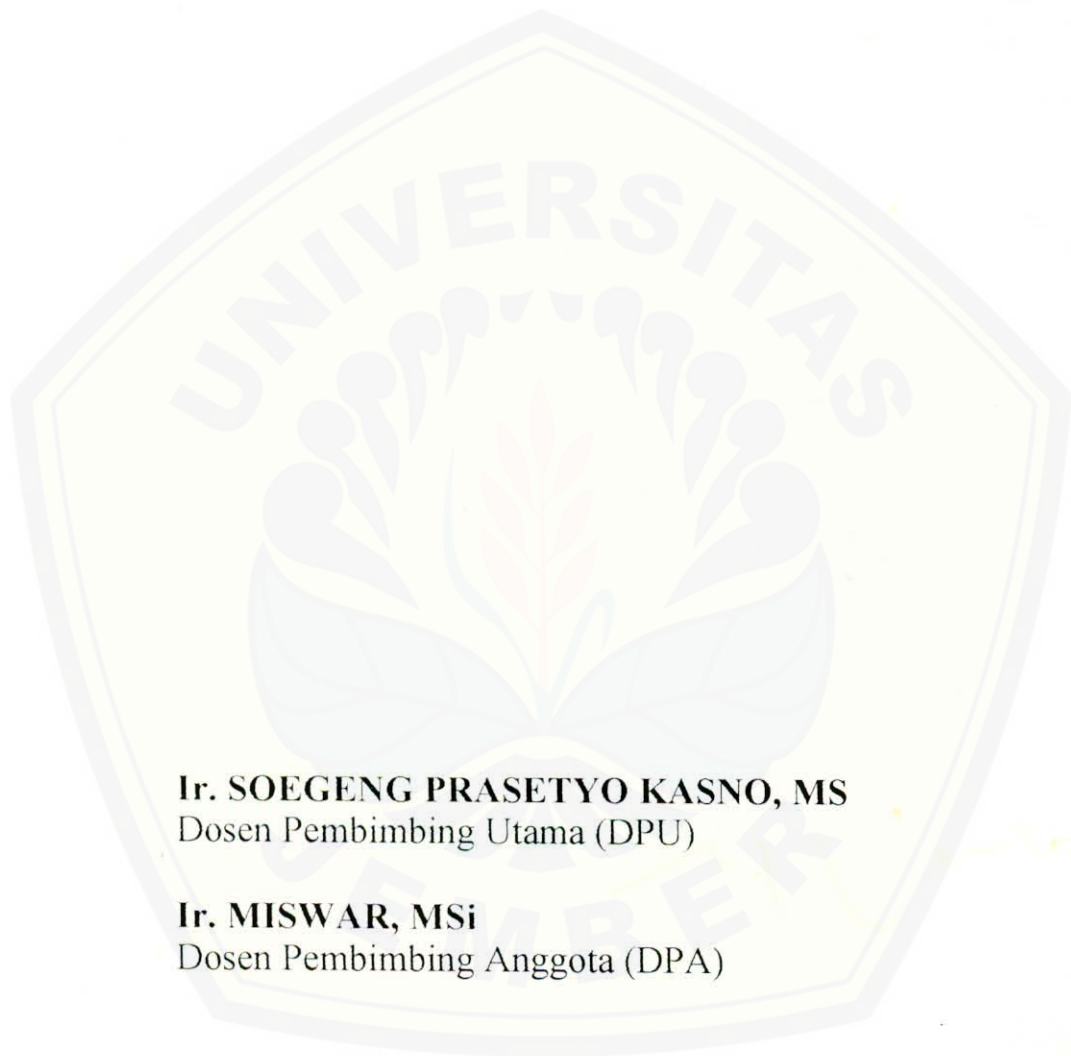


Mengesahkan

Dekan



Mudjiharjati, MS  
NIP. 130 609 808



**Ir. SOEGENG PRASETYO KASNO, MS**  
Dosen Pembimbing Utama (DPU)

**Ir. MISWAR, MSi**  
Dosen Pembimbing Anggota (DPA)

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan hidayahNya, hingga karya ilmiah tertulis (skripsi) berjudul **“Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Dinamika Kandungan Protein dan Klorofil Daun Kedelai (*Glycine max* L. Merrill) Pada Fase Pertumbuhan Vegetatif”** ini dapat terselesaikan.

Skripsi ini disusun untuk menyelesaikan pendidikan strata satu pada Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember, sejak Pebruari – Oktober 2000.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Ketua Jurusan Agronomi Fakultas pertanian Universitas Jember.
3. Ir. Soengeng Prasetyo Kasno, MS selaku dosen pembimbing utama (DPU) yang telah memberikan bimbingannya selama penyusunan skripsi.
4. Ir. Miswar, MSi selaku dosen pembimbing anggota (DPA) yang telah memberikan bimbingannya baik selama analisis di laboratorium maupun dalam penyusunan skripsi.
5. Dr. Ir. Ketut Anom Wijaya selaku Tim Penguji Anggota II yang telah memberikan masukan dan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MSc selaku ketua laboratorium biologi molekuler Universitas Jember yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk mengadakan penelitian di laboratorium biologi molekuler Universitas Jember.
7. Kepala perpustakaan baik di lingkungan Fakultas Pertanian maupun Universitas Jember atas segala bantuan dan fasilitasnya.

Akhirnya penulis berharap semoga karya ilmiah tertulis ini dapat bermanfaat nantinya.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
RINGKASAN .....	x
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Permasalahan .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	2
1.3 Manfaat Penelitian .....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Peranan Sulfur pada Proses Metabolisme Tanaman .....	4
2.2 Asimilasi Sulfur pada Tanaman .....	5
2.3 Penyerapan dan Distribusi Sulfur pada Tanaman .....	7
2.4 Hipotesis .....	7
III. BAHAN DAN METODE	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	8
3.2 Bahan dan Alat .....	8
3.3 Metode Penelitian .....	8
3.4 Pelaksanaan Penelitian	
3.4.1 Penanaman .....	8
3.4.2 Pemberian Sulfur .....	9
3.4.3 Pemeliharaan .....	9
3.4.4 Pemanenan .....	9
3.5 Parameter Pengamatan .....	9
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Pengamatan .....	12
4.2 Pembahasan .....	12

V. KESIMPULAN DAN SARAN

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

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN-LAMPIRAN

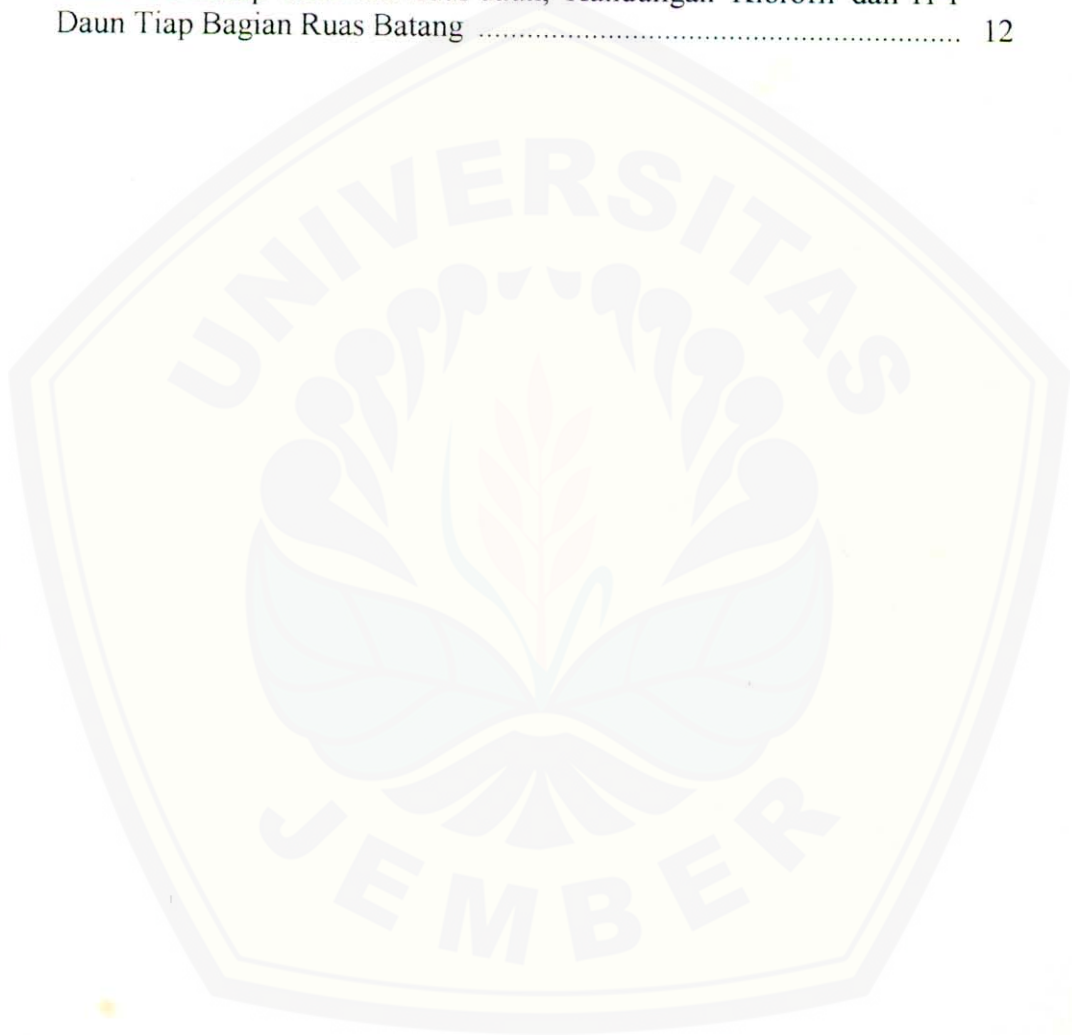


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Jalur Asimilasi Sulfat pada Tanaman .....	6
2. Grafik Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Rata-rata Luas Daun Tiap Bagian Ruas Batang .....	13
3. Grafik Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Rata-rata Luas Total Daun.....	14
4. Grafik Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Kandungan Klorofil Daun per Luas Daun Tiap Bagian Ruas Batang .....	15
5. Grafik Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Kandungan Klorofil Daun per luas Total Daun .....	16
6. Grafik Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Kandungan TPT Daun per Luas Daun Tiap Bagian Ruas Batang .....	17
7. Grafik Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Kandungan TPT Daun per Luas Total Daun .....	18
8. Pengaruh Saat Pemberian Sulfur 7 hst (P1), 14 hst (P2) dan 21 hst (P3) Terhadap Pola Fraksi-fraksi Protein (1, 2, 3, ..., 11) Daun-daun Pada Ruas 1 dan 2 dari Atas (L1), Ruas 3 dan 4 dari Atas (L2) dan Ruas 5, 6 dan 7 dari Atas (L3) .....	19

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rangkuman Hasil Pengukuran dan Analisis Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Rata-rata Luas daun, Kandungan Klorofil dan TPT Daun Tiap Bagian Ruas Batang .....	12





DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Bahan Kimia Penyusun Larutan Hara Tanaman Kedelai

Lampiran 2. Bagan Pelaksanaan Penelitian



Febti Suryani (9415101130), **Pengaruh Saat Pemberian Sulfur Terhadap Dinamika Kandungan Protein dan Klorofil Daun Kedelai (*Glycine max* L. Merrill)**, dibawah bimbingan Ir. Soegeng Prasetyo Kasno, MS selaku dosen pembimbing utama (DPU) dan Ir. Miswar, Msi selaku dosen pembimbing anggota (DPA).

### RINGKASAN

Defisiensi S yang terjadi pada tanaman dapat menurunkan pembelahan sel mesofil sehingga memperkecil ukuran daun, menurunkan kandungan klorofil daun serta membatasi sintesis protein dan jumlah keberadaan organ-organ fotosintesis melalui pembatasan jumlah metionin dan sistein yang tersedia untuk membentuk protein baru. Saat pemberian sulfur yang berbeda-beda selama fase pertumbuhan vegetatif diduga mempengaruhi dinamika kandungan protein dan klorofil daun kedelai.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh saat pemberian sulfur terhadap kandungan klorofil serta kandungan dan pola protein daun kedelai pada fase pertumbuhan vegetatif. Bahan tanam yang digunakan kedelai varietas Wilis yang ditanam pada pasir steril. Penelitian dilakukan dengan 3 perlakuan yaitu : saat pemberian sulfur 7 hst (P1), 14 hst (P2) dan 21 hst (P3) yang dilakukan dengan menyiramkan 200 ml 0,4 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  setiap 3 hari sekali bersama-sama dengan pemberian larutan hara sampai umur 30 hari. Panen dilakukan saat tanaman berumur 35 hari dengan memisahkan daun-daun pada ruas 1 dan 2 dari atas (L1), ruas 3 dan 4 dari atas (L2) dan ruas 5, 6 dan 7 dari atas (L3).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa defisiensi S yang terjadi karena tertundanya saat pemberian sulfur menurunkan kandungan klorofil daun tanaman kedelai varietas Wilis, dimana kandungan klorofil daun cenderung menurun dengan semakin tertundanya saat pemberian sulfur. Rata-rata luas daun dan kandungan total protein terlarut (TPT) daun tertinggi pada P2, dimana saat pemberian sulfur 14 hst (P2) diduga dapat meningkatkan biosintesis fraksi-fraksi protein tertentu pada daun L2 dan L3 pada P2.

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Kedelai merupakan tanaman pangan yang penting karena bijinya mengandung protein dan minyak dalam konsentrasi tinggi (Serretti *et al.*, 1994), dalam 100 gram bahan, kedelai mengandung 35% protein. Bahkan pada varietas yang unggul, kandungan protein kedelai mencapai 40–43%, sedangkan kandungan lemak bijinya berkisar antara 16–20% (Syam dkk., 1990).

Protein kedelai mengandung asam amino esensial yang diperlukan manusia dan ternak. Namun kelemahan protein kedelai terdapat pada rendahnya kandungan asam amino yang mengandung sulfur, yaitu sistein dan metionin (Mimbar, 1991). Jurgens (1993) menyatakan bahwa nilai gizi protein kedelai dapat ditingkatkan dengan meningkatkan jumlah asam amino sulfur, yaitu metionin dan sistein kandungannya.

Pemberian sulfur ke dalam tanah dapat meningkatkan ketersediaan sulfat sehingga cepat diserap oleh tanaman. Keberadaan sulfur dalam tubuh tanaman bersama-sama nitrogen akan membentuk asam amino-asam amino yang merupakan substansi dasar penyusun protein (Ma'sum *et al.*, 1992). Sulfur yang disuplai dalam bentuk sulfat ke sistem perakaran, pertama kali didistribusikan ke daun-daun yang sedang mengalami perluasan (Smith dan Lang, 1988; Adiputra dan Anderson, 1992,1993). Sunarpi dan Anderson (1996a) menyatakan bahwa laju penyerapan dan pengeluaran sulfur oleh suatu daun lebih besar pada saat daun mengalami perluasan 70%. Lebih lanjut dikatakan bahwa sulfur yang diserap oleh daun selama awal perkembangan terutama tergabung dalam kelompok yang kurang mobil dibanding sulfur yang diserap pada tahap perkembangan daun selanjutnya.

Sunarpi dan Anderson (1996b) menyatakan bahwa ketika daun-daun tanaman pada kondisi kecukupan S mencapai perluasan 70%, daun-daun tersebut mengeluarkan fraksi S terlarut sebagian besar dalam bentuk sulfat ke daun-daun baru yang sedang mengalami perluasan tetapi fraksi S tidak terlarut tidak

diremobilisasi. Rendahnya remobilisasi fraksi S tidak terlarut menunjukkan tingginya kadar N dalam media..

Anderson (1990) menyatakan bahwa defisiensi S membatasi sintesis protein dan jumlah keberadaan organ-organ fotosintesis melalui pembatasan jumlah metionin dan sistein yang tersedia untuk membentuk protein baru. Sexton *et al.* (1997) menyatakan bahwa kandungan klorofil daun menurun rata-rata 40% pada kondisi defisiensi S dan secara linear berhubungan dengan kandungan sulfur daun.

Wilis merupakan salah satu kultivar kedelai lokal yang banyak ditanam oleh petani, yang digunakan sebagai bahan dasar pembuatan susu kedelai. Poerwoko dkk. (1995) menyatakan bahwa meskipun produktivitas kultivar kedelai lokal rendah, namun kultivar kedelai lokal mempunyai tingkat adaptasi lebih tinggi terhadap lingkungannya sehingga hasilnya lebih stabil.

## 1.2 Intisari Permasalahan

Berdasarkan uraian di atas, bagaimanakah pengaruh fisiologis ketersediaan sulfur pada tanaman kedelai varietas Wilis terhadap kandungan dan pola protein serta kandungan klorofil daunnya apabila sulfur dalam konsentrasi yang sama diberikan pada saat yang berbeda-beda selama fase pertumbuhan vegetatif.

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh saat pemberian sulfur terhadap kandungan klorofil daun kedelai pada fase pertumbuhan vegetatif.
2. Mengetahui pengaruh saat pemberian sulfur terhadap kandungan dan pola protein daun kedelai pada fase pertumbuhan vegetatif.

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Merupakan sumbangan pemikiran bagi pemerintah dalam upaya meningkatkan gizi masyarakat.

2. Dapat dijadikan informasi bagi masyarakat petani dalam upaya meningkatkan produksi kedelai.
3. Dapat digunakan sebagai bahan acuan bagi penelitian selanjutnya.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Peranan Sulfur pada Proses Metabolisme Tanaman

Sulfur merupakan salah satu dari enam unsur hara makro yang dibutuhkan oleh tanaman dan ditemukan dalam asam amino-asam amino sistein dan metionin serta pada berbagai senyawa metabolit (Leustek dan Saito, 1999). Beberapa fitoalexin yang mengandung sulfur seperti camalexin, penting pada pemberantasan patogen-patogen tanaman (Zhao *et al.*, 1998). Sulfat organik membantu mencegah melarutnya bahan organik di dalam air, dimana hal ini penting dalam mekanisme cekaman terhadap salinitas (Agustina, 1990).

Sumber utama sulfur adalah anion sulfat (Uria-Nickelsen *et al.*, 1993, 1994; Beil *et al.*, 1996). Seperti halnya nitrogen, kelimpahan sulfur dalam tanaman hanya 3-5% (Leustek dan Saito, 1999). Sebaliknya kadar sulfat anorganik yang tersedia dalam tanah rendah (David *et al.*, 1982; Autry dan Fitzgerald, 1990; Whalen dan Warman, 1996). Ma'sum *et al.* (1992) menyatakan bahwa pemberian sulfur ke dalam tanah dapat meningkatkan ketersediaan sulfat sehingga cepat diserap oleh tanaman. Keberadaan sulfur dalam tubuh tanaman bersama-sama nitrogen akan membentuk asam amino-asam amino yang merupakan substansi dasar penyusun protein. Anderson (1990) menyatakan bahwa asimilasi N berhubungan dengan metabolisme S dan sintesis protein, sehingga jika metabolisme S menurun maka asimilasi N juga menurun.

Sulfur merupakan unsur yang tidak mobil dalam tanaman, sehingga gejala defisiensi S pertama kali tampak pada daun-daun muda (Mengel dan Kirkby, 1982; Salisbury dan Ross, 1992). Apabila daun-daun muda mengalami defisiensi S, maka fraksi utama sulfur adalah protein. Remobilisasi S dari protein tidak terjadi pada kondisi defisiensi S kecuali N juga berkurang (Sunarpi dan Anderson, 1996a, 1997a). Kadar N media yang rendah meningkatkan pengeluaran sulfat dari daun-daun dewasa (Sunarpi dan Anderson, 1997b).

Burke *et al.* (1986) menyatakan bahwa defisiensi S yang terjadi pada tanaman gandum (*Triticum aestivum* L.) menurunkan pembelahan sel mesofil sehingga memperkecil ukuran daun serta menurunkan kandungan klorofil dan

protein tiap kloroplas tetapi tidak mempengaruhi jumlah kloroplas tiap sel. Sexton *et al.* (1998) menyatakan bahwa selama fase pertumbuhan vegetatif, tanaman yang semula mengalami defisiensi S tidak dapat mengubah ukuran daunnya yang kecil ketika tanaman tersebut diberi sulfur. Anderson (1990) menyatakan bahwa defisiensi S membatasi sintesis protein dan jumlah keberadaan organ-organ fotosintesis, melalui pembatasan jumlah metionin dan sistein yang tersedia untuk membentuk protein baru.

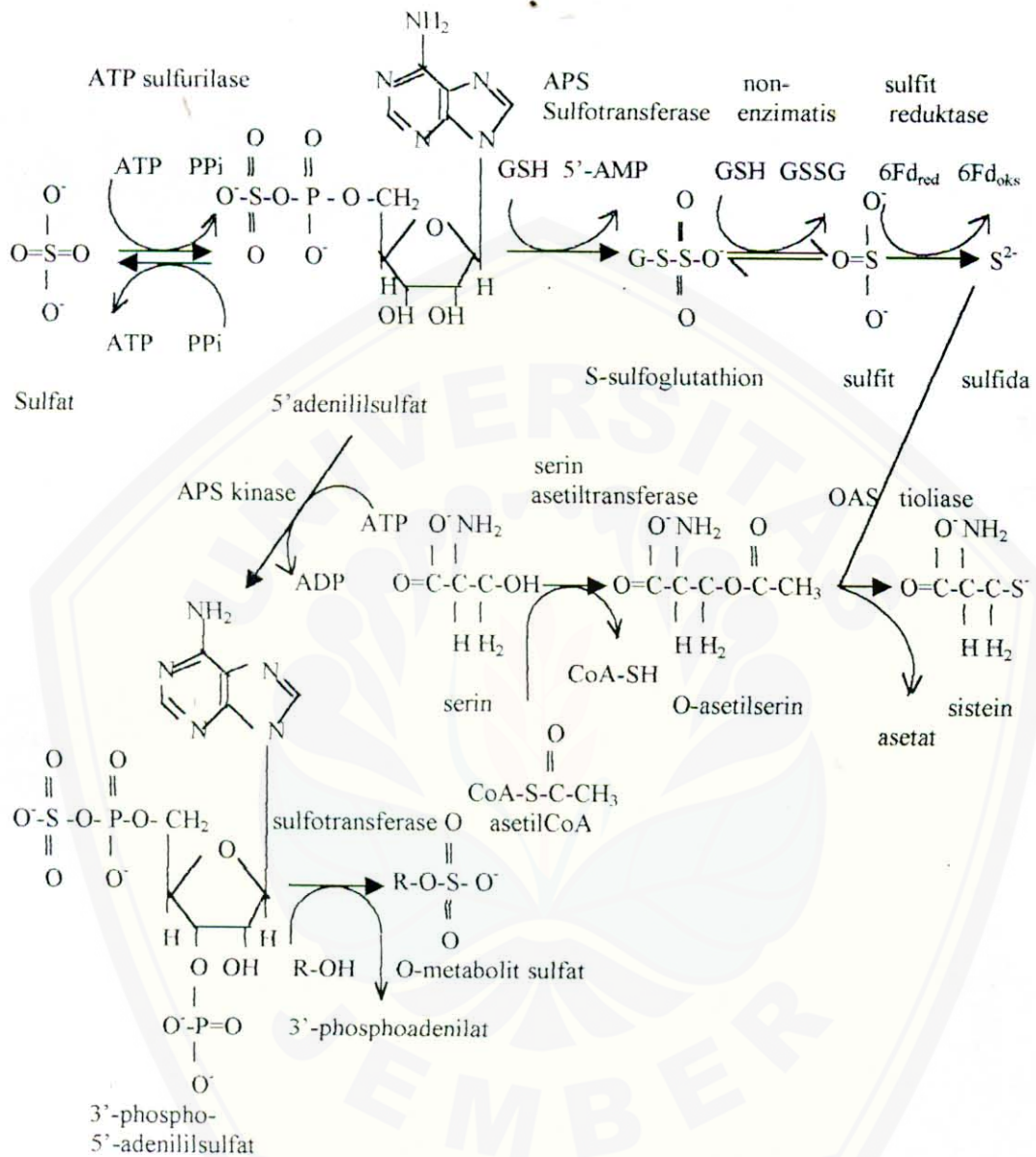
## 2.2 Asimilasi Sulfur pada Tanaman

Pada tanaman, sulfur diasimilasi menjadi sistein melalui jalur biosintesis sistein (Schmidt dan Jager, 1992). Sulfat anorganik direduksi menjadi sulfit dan selanjutnya menjadi sulfida melalui jalur reduksi sulfat, dimana enzim-enzim yang mengkatalisisnya terdapat di kloroplas. Selama reaksi reduktif ini, atom sulfur diduga berada pada suatu bentuk tiol-terikat (Brunold, 1990).

Sulfat dapat ditambahkan ke suatu gugus hidroksil dari suatu molekul organik. Reaksi ini disebut sulfatasi yang dikatalisis oleh sulfotransferase. Sebaliknya, sistein yang mengandung sulfur tereduksi dihasilkan dari sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) melalui beberapa tahap reaksi dimana delapan elektron ditambahkan untuk membentuk sulfida ( $\text{S}^{2-}$ ). Reduksi sulfat menjadi sulfida membutuhkan 732 kJ/mol.



Sistein sebagai hasil akhir dari jalur reduktif ini merupakan materi awal untuk membentuk metionin, glutathion dan metabolit-metabolit lain yang mengandung sulfur tereduksi (Gambar 1) (Leustek dan Saito, 1999).



Gambar 1. Jalur Asimilasi Sulfat pada Tanaman. Garis teratas pada gambar menunjukkan aktivasi dan reduksi  $\text{SO}_4^{2-}$ , garis kedua ke kiri menunjukkan jalur sulfatasi dan garis kedua ke kanan menunjukkan asimilasi sulfur tereduksi menjadi sistein.

Selama reduksi, sulfat pertama kali diaktifkan oleh ATP yang dikatalisis ATP sulfurylase untuk membentuk adenosin phosphosulfat, selanjutnya direduksi menjadi sulfite bebas yang dikatalisis oleh adenosin phosphosulfat reduktase (Setya *et al.*, 1996). Seperti halnya penyerapan sulfat, ATP sulfurylase dipengaruhi



oleh defisiensi S dan dihambat oleh pemberian sulfat atau bentuk tereduksi dari sulfur (Chen dan Leustek, 1995; Logan *et al.*, 1996).

Fiksasi sulfur tereduksi menjadi senyawa organik O-asetilserin menunjukkan suatu tahap penting dalam biosintesis sistein dan dikatalisis oleh enzim sistein sintase pada akhir suatu jalur metabolit (Anderson, 1990; Leustek, 1996).

### 2.3 Penyerapan dan Distribusi Sulfur pada Tanaman

Pada tumbuhan tingkat tinggi, sulfur diserap oleh akar dalam bentuk  $\text{SO}_4^{2-}$  dan ditransportasikan melalui xilem ke daun untuk direduksi menjadi sistein dan metionin atau digabungkan dalam protein dan peptida-peptida yang mengandung sistein seperti glutathion. Penyerapan dan distribusi lebih lanjut  $\text{SO}_4^{2-}$  ke daun berdasarkan kebutuhan, dimana daun-daun yang sedang berkembang menyerap sulfur lebih kuat, kemudian akan mengalami kehilangan sulfur setelah luasannya penuh (Sunarpi dan Anderson, 1996a).

Ketika mengalami perluasan 70%, daun-daun tanaman pada kondisi kecukupan S mengeluarkan fraksi S terlarut sebagian besar dalam bentuk  $\text{SO}_4^{2-}$  ke daun-daun baru yang sedang mengalami perluasan, tetapi fraksi S tidak terlarut tidak diremobilisasi (Sunarpi dan Anderson, 1996b). Sunarpi dan Anderson (1997a) menyatakan bahwa fraksi S terlarut menurun ke kadar yang sangat rendah pada daun-daun dewasa dan daun-daun yang sedang mengalami pendewasaan terutama pada tanaman yang tumbuh pada media dengan kadar N rendah. Selanjutnya setelah fraksi S terlarut menurun, sampai 40% fraksi S tidak terlarut dikeluarkan. Penurunan fraksi S tidak terlarut pada daun-daun dewasa diikuti oleh peningkatan homoglutathion (hGSH), sistein dan metionin.

### 2.4 Hipotesis

1. Terdapat saat pemberian sulfur yang berpengaruh terhadap kandungan klorofil daun kedelai pada fase pertumbuhan vegetatif.
2. Terdapat saat pemberian sulfur yang berpengaruh terhadap kandungan dan pola protein daun kedelai pada fase pertumbuhan vegetatif.

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di rumah kawat (koi) Fakultas Pertanian dan laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember, pada ketinggian 89 m dpl mulai Pebruari – juni 2000.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain: benih kedelai varietas Wilis, pasir steril, legin, larutan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , larutan hara (lihat lampiran), aquadest, 10 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , etanol 96%, buffer ekstraksi kedelai, buffer ekstraksi kedelai (tanpa PVP), fenol, metanol 100% yang mengandung 0,1 M amonium asetat, metanol 100% dan lain-lain.

Alat-alat yang digunakan antara lain: polibag 20 x 30 cm, neraca, gelas ukur, beaker glass, pipet, mortal dan pestle, tissue, eppendorf, tabung sentrifus 45 ml, label, gunting, vortex, sentrifus, spektrofotometer, elektroforesis set, shaker dan lain-lain.

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan sesuai dengan perlakuan saat pemberian sulfur, yaitu:

P1 = saat pemberian sulfur mulai 7 hst

P2 = saat pemberian sulfur mulai 14 hst

P3 = saat pemberian sulfur mulai 21 hst

#### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

##### 3.4.1 Penanaman

Benih kedelai varietas Wilis yang telah dilumuri dengan legin ditanam pada media pasir dalam polibag ukuran 20 x 30 cm, sebanyak 24 polibag dengan 4 biji/ polibag.

### 3.4.2 Pemberian Sulfur

Pemberian sulfur dilakukan dengan menyiramkan 0,4 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sebanyak 200 ml yang dilakukan tiap pagi dan sore hari. Dilakukan setiap tiga hari sekali (sesuai dengan perlakuan) bersama-sama dengan pemberian larutan hara, dan dihentikan saat tanaman berumur 30 hari.

### 3.4.3 Pemeliharaan

Pemeliharaan tanaman dilakukan setiap hari (diluar pelaksanaan perlakuan), dengan menyiramkan 1/100 larutan hara sebanyak 200 ml yang dilakukan pada pagi dan sore hari. Sedangkan penyiangan gulma dan pengendalian hama dan penyakit dilakukan sesuai kebutuhan.

### 3.4.4 Pemanenan

Panen dilakukan saat tanaman berumur 35 hari, dengan memisahkan daun-daun tanaman pada masing-masing perlakuan menjadi tiga bagian yaitu : daun-daun pada ruas 1 dan 2 dari atas (L1), ruas 3 dan 4 dari atas (L2) dan ruas 5, 6 dan 7 dari atas (L3).

### 3.5 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Luas daun diukur dengan *Leaf Area Meter*.
2. Kandungan klorofil daun ditentukan dengan metode ekstraksi etanol (Wintermans dan De Mots, 1965)
  - a. 1 g daun digerus dalam mortal dingin dengan penambahan  $\text{N}_2$  cair sampai lembut, kemudian tambahkan 5 ml 10 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .
  - b. 40  $\mu\text{l}$  hasil gerusan dimasukkan dalam tabung eppendorf 1,5 ml dan ditambah dengan 960  $\mu\text{l}$  etanol absolut lalu divorteks.
  - c. Campuran diinkubasi pada suhu 4°C dalam keadaan gelap selama 30 menit.
  - d. Sentrifugasi campuran pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit.
  - e. Ukur absorban pada  $\lambda 649$  nm dan  $\lambda 665$  nm.

Perhitungan :

$$\text{Klorofil a} = (13,7 \times A665) - (5,76 \times A649) = \mu\text{g klorofil/ml}$$

$$\text{Klorofil b} = (25,8 \times A649) - (7,60 \times A665) = \mu\text{g klorofil/ml}$$

$$\text{Total klorofil} = \text{klorofil a} + \text{klorofil b}$$

3. Kandungan TPT daun ditentukan dengan cara sebagai berikut :
- a. Ekstraksi protein dengan metode fenol, modifikasi dari Schuster dan Davis dalam Anonim (1999) :
- 1) 3 g daun digerus dalam mortal dingin dengan penambahan  $N_2$  cair sampai lembut, kemudian tambahkan 9 ml buffer ekstraksi (0,5 Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M KCl; 0,05 M Na-EDTA pH 7,4; 2%  $\beta$ -mercaptoethanol; 0,3% SDS; 0,7 M sukrosa dan 10% PVP tidak larut) dan 9 ml redistilasi fenol jenuh air lalu diaduk.
  - 2) Hasil gerusan dimasukkan dalam tabung sentrifus 45 ml dan divorteks.
  - 3) Sentrifugasi campuran pada kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit.
  - 4) Kumpulkan fase fenol protein dan masukkan dalam tabung sentrifus 45 ml baru, kemudian ulangi langkah 5.
  - 5) Tambahkan buffer ekstraksi (tanpa PVP) dengan suatu volum yang sama ke dalam campuran dan divorteks.
  - 6) Kumpulkan fase fenol protein yang tersisa dan masukkan dalam tabung sentrifus 45 ml lalu dipresipitasi dengan 3-5 volum 0,1 M amonium asetat yang dilarutkan dalam 100% metanol pada suhu  $-25^\circ\text{C}$ .
  - 7) Sentrifugasi fase fenol protein pada kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit.
  - 8) Kumpulkan protein dalam eppendorf 1,5 ml dan dicuci dengan larutan metanol, kemudian pellet protein dipecah-pecah dengan tusuk gigi.
  - 9) Sentrifugasi pellet protein pada kecepatan 7.500 rpm selama 5 menit, kemudian ulangi pencucian dua kali.
- b. TPT ditentukan dengan metode Bradford (1976) sebagai berikut :
- 1) Standar grafik ditentukan dengan grade 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25 dan 30.

- 2) BSA diambil sebanyak 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25 dan 30  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan dalam 10 eppendorf 1,5 ml, kemudian tambahkan aquadest pada masing-masing jumlah BSA di atas sampai volum 100  $\mu\text{l}$  dan divorteks.
  - 3) Ukur absorban standar BSA pada  $\lambda 595$  nm, kemudian buat standar grafik hasil pengukuran absorban dengan regresi.
  - 4) 5  $\mu\text{l}$  masing-masing sampel protein diambil dan dimasukkan dalam 9 eppendorf 1,5 ml, kemudian tambahkan 5  $\mu\text{l}$  BSA dan divorteks.
  - 5) Ukur absorban sampel protein pada  $\lambda 595$  nm.
  - 6) Konsentrasi sampel protein ditentukan dengan persamaan regresi yang diperoleh dari langkah 5.
  - 7) TPT ditentukan dengan mengalikan konsentrasi protein yang diperoleh dengan jumlah protein yang larut dalam buffer lisis kedelai ( $\mu\text{g}$ ).
- c. Elektroforesis protein sebagai berikut :
- 1) Buat 10 ml *Lower Gel* 10% dan masukkan dalam tempat gel, kemudian diamkan sampai terbentuk gel.
  - 2) Buat 5 ml *Upper Gel* 4% dan masukkan dalam tempat gel serta pasang sisir di bagian atasnya, kemudian diamkan sampai terbentuk sumur-sumur tempat protein diload.
  - 3) 25  $\mu\text{g}$  masing-masing sampel protein diambil dan dimasukkan dalam eppendorf 0,6 ml, kemudian tambahkan 5  $\mu\text{l}$  sampel buffer 1 *SDS Page* pada masing-masing sampel protein tersebut lalu divorteks.
  - 4) Masing-masing sampel protein di atas dimasukkan dalam sumur-sumur tempat protein diload dan masukkan marker protein pada salah satu sumur yang lain, kemudian dirunning sampai terbentuk gel elektroforesis protein.
  - 5) Gel elektroforesis protein yang terbentuk disustaining selama  $\pm 12$  jam, kemudian didestaining sampai pita-pita protein pada gel terlihat jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiputra, IGK dan JW Anderson. 1992. Distribution and Redistribution of Sulphur Taken Up from Nutrient Solution During Vegetative Growth in Barley. *Physiol Plant.* 85:453-460.
- 
- \_\_\_\_\_. 1993. Effect of Sulphur Nutrition and Leaf Excision on Distribution and Redistribution of Sulphur in Barley. *In* NJ Barrow (Ed) *Plant Nutrition – from Genetic Engineering to Field Practise.* Kluwer Academic. Dordrecht. *The Netherlands*: 239-242.
- Agustina, L. 1990. *Nutrisi Tanaman.* Rineka Cipta. Jakarta: 69.
- Anderson, JW. 1990. Sulfur Metabolism in Plants:327-381. *In* BJ Mifflin and PJ Lea (Ed) *The Biochemistry of Plants.* 16: Academic Press. San Diego.GA
- Anonim. 1999. *Workshop on Molecular Biology.* July 21 – August 7.Jember. Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember: 55-65.
- Autry dan J Fitzgerald. 1990. Sulfonate S: A Major Form of Forest Soil Organic Sulfur. *Biol. Fertil. Soils.* 10:50-56.
- Beil, S. Kertesz MLT dan Cook A. 1996. The Assimilation of Sulfur from Multiple Source and Its Correlation with Expression of The Sulfate – Starvation Induced Stimulation in *Pseudomonas putida* S313. *Microbiology.* 142:1989-1995.
- Bradford, MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein - Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brunold, C. 1990. Reduction Sulfate to Sulfide. *In* H Rennenberg. C Brunold. IJ De Kok. I Stulen (ed). *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants.* SPB Academic. The Hague. *The Netherlands*:13-32.
- Burke, JJ. P Holloway dan MJ Dalling. 1986. The Effect of Sulfur Deficiency on The Organization and Photosynthetic Capability of Wheat Leaves. *Plant Physiol.* 125:371-375.
- Chen, Y dan T Leustek. 1995. Sulfate – Regulated Expression of ATP Sulfurylase and Adenosine-5'-phosphosulfate Kinase in *Brassica juncea* (Abstract No. 319). *Plant Physiol.* 108.

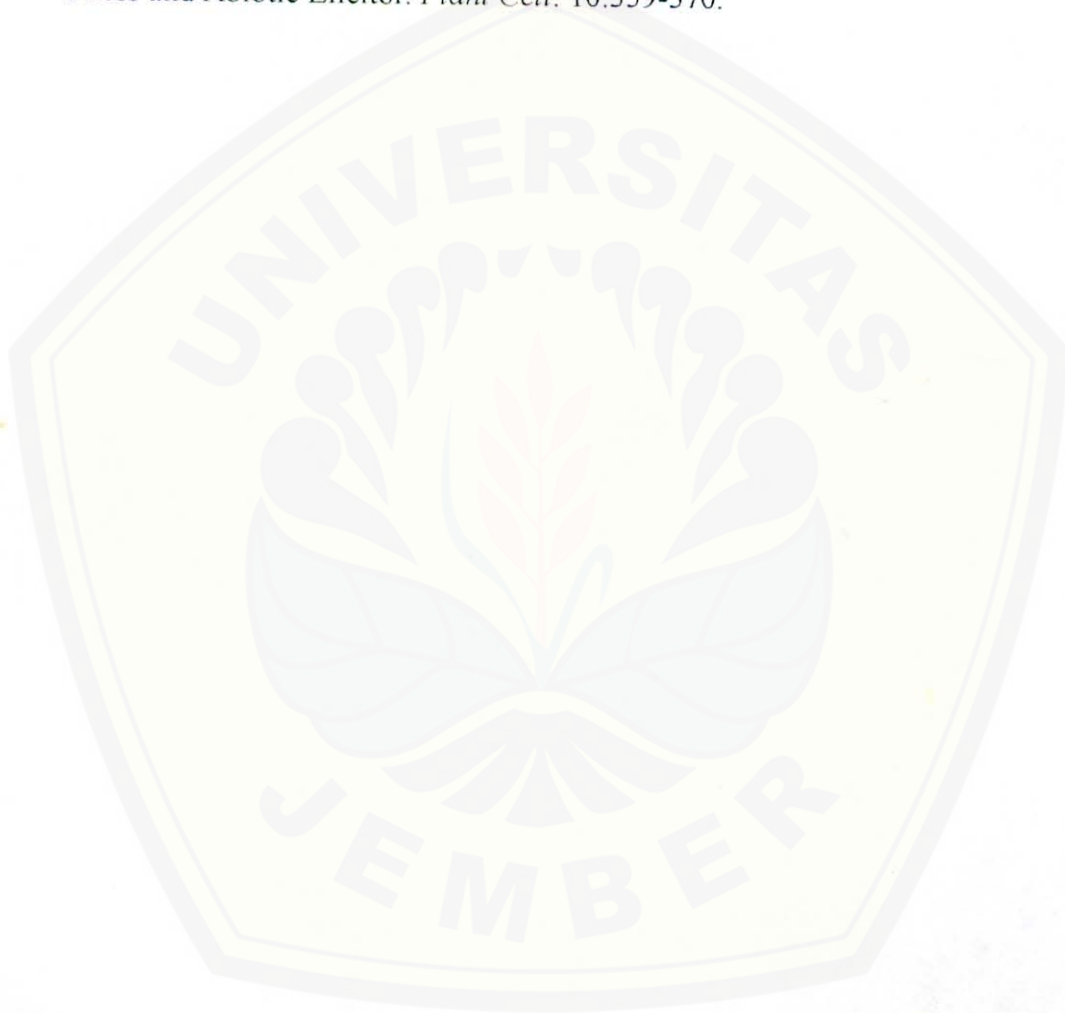
- David, M. Mitchell M dan Nakas J. 1982. Organic and Inorganic Sulfur Constituents of A Forest Soil and Their Relationship in Microbial Activity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46:847-852.
- Jurgens, MII. 1993. *Animal Feeding and Nutrition*. Kendall Hunt. Dubuque. IA.
- Lakitan, B. 1995. *Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan*. PT Rajagrafindo Persada.. Jakarta: 82.
- Leustek, T. 1996. Molecular Genetics of Sulfate Assimilation in Plants. *Physiol Plant.* 97:411-419.
- Leustek, T dan K Saito. 1999. Sulfate Transport and Assimilation in Plants. *Plant Physiol.* 120:637-643.
- Logan, HM. Cathala N. Grignon C dan Davidian. 1996. Cloning of A cDNA Encoded by A Member of The *Arabidopsis Thaliana* ATP Sulfurylase Multigene Family: Expression Studies in Yeats and in Relation to Plant Sulfur Nutrition. *J Biol. Chem.* 271: 12227-12233.
- Ma'sum, M. L Endang S dan Mahrub. 1992. Optimasi Pemberian Belerang Untuk Tanaman Kedelai Pada Tanah Entisol dan Vertisol Lombok. *Dalam Prosiding Lokakarya Penelitian Komoditas dan Studi Khusus (4)*.
- Mimbar, SM. 1991. *Pengaruh Kerapatan Tanaman Terhadap Keguguran Organ-Organ Reproduksi Retensi Polong dan Hasil Kedelai Wilis*. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang.
- Mengel, K dan EA Kirkby. 1982. *Principle's of Plant Nutrition International Potas Institute*. Bern. Zwitserlands:187-190.
- Poerwoko, MS. Widoyo. Gatot Subroto dan Nurul Sjamsijah. 1995. Peningkatan Kuantitas dan Kualitas Hasil Kedelai dengan Pemuliaan (Evaluasi Sumber Daya Genetik Evaluasi Daya Hasil Silangan Kedelai Penampilan Galur-galur F<sub>3</sub>). *Dalam Pros. Simposium Pemuliaan Tanaman III*: 150-151.
- Salisbury, FB dan CW Ross. 1992. *Plant Physiology Ed 4*. Wadsworth. Belmont. CA: 207-210.
- Schmidt, A dan K Jager. 1992. Open Question about Sulfur Metabolism in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:325-349.
- Seputro, D. 1994. *Pengantar Fisiologi Tumbuhan*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta: 18.

- Serretti, C. WTJ Schaapaugh dan RC Leiffel. 1994. Amino Acid Profile of High Seed Protein Soybean. *Crop Sci.* 3:207-209.
- Setya, A. Murrilo M dan T Leustek. 1996. Sulfate Reduction in Higher Plants: Molecular Evidence for A Novel 5'-adenylylsulfate Reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13383-13388.
- Sexton, PJ. WD Batchelor dan RM Shibles. 1997. Sulfur Availability, Rubisco Content and Photosynthetic Rate of Soybean. *Crop Sci.* 37:1801-1806.
- Sexton, PJ. NC Paek dan RM Shibles. 1998. Effect of Nitrogen Source and Timing of Sulfur Deficiency on Seed Yield and Expression of 11S and 7S Seed Storage Protein of Soybean. *Field Crops Research.* 59:1-8.
- Smith, IK dan AL Lang. 1988. Translocation of Sulfur in Soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant Physiol.* 86:798-802.
- Sunarpi dan JW Anderson. 1996a. Distribution and Redistribution of Sulfur Supplied as [<sup>35</sup>S]Sulfate to Roots During Vegetative Growth of Soybean. *Plant Physiol.* 110:1151-1157.
- \_\_\_\_\_. 1996b. Effect Sulfur Nutrition on The Redistribution of Sulfur in Vegetative Soybean Plants. *Plant Physiol.* 112:623-631.
- \_\_\_\_\_. 1997a. Effect of Nitrogen Nutrition on Remobilization of Protein Sulfur in The Leaves of Vegetative Soybean and Associated Changes in Soluble Sulfur Metabolites. *Plant Physiol.* 115:1671-1680.
- \_\_\_\_\_. 1997b. Effect of Nitrogen Nutrition on The Export of Sulfur from Leaves in Soybean. *Plant Soil.* 188:177-187.
- Syam, M. Suprpto HS dan Adi W. 1990. *Kedelai dan cara bercocok tanamnya*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor.
- Uria – Nickelsen, MR. Lead Better ER dan Godcharx III W. 1993. Sulfonate Sulfur Assimilation by Yeasts Resembles That of Bacteria. *FEMS Microbial Lett.* 114:73-77.
- \_\_\_\_\_. 1994. Comparative Aspect of Utilization of Sulfonate and Other Sulfur Sources by *Escherichia Coli* K12. *Arch. Microbiol.* 161:434-438.
- Whalen, J. dan P Warman. 1996. Arylsulfatase Activity in Soil and Soil Extracts Using Natural and Artificial Substrates. *Biol. Fert. Soil.* 22:373-378.



Wintermans, JFGH dan A De Mots. 1965. Spectrophotometric Charateristic of Chlorophyl and Their Pheophytins in Ethanol. *Biochem. Biophys. Acta.* 109:448-453.

Zhao, JM. William CC dan Last RL. 1998. Induction of Arabidopsis Trytophan Pathway Enzymes and Camalexin by Amino Acid Starvation, Oxidative Stress and Abiotic Elicitor. *Plant Cell.* 10:359-370.





**LAMPIRAN-LAMPIRAN**

Lampiran 1. Komposisi Bahan Kimia Penyusun Larutan Hara Tanaman Kedelai

Komposisi hara makro :

1. 5 mM  $\text{KNO}_3$
2. 2,96 mM  $\text{KCl}$
3. 0,1 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
4. 2,1 mM  $\text{CaCl}_2$
5. 1,8 mM  $\text{MgCl}_2$

Komposisi hara mikro :

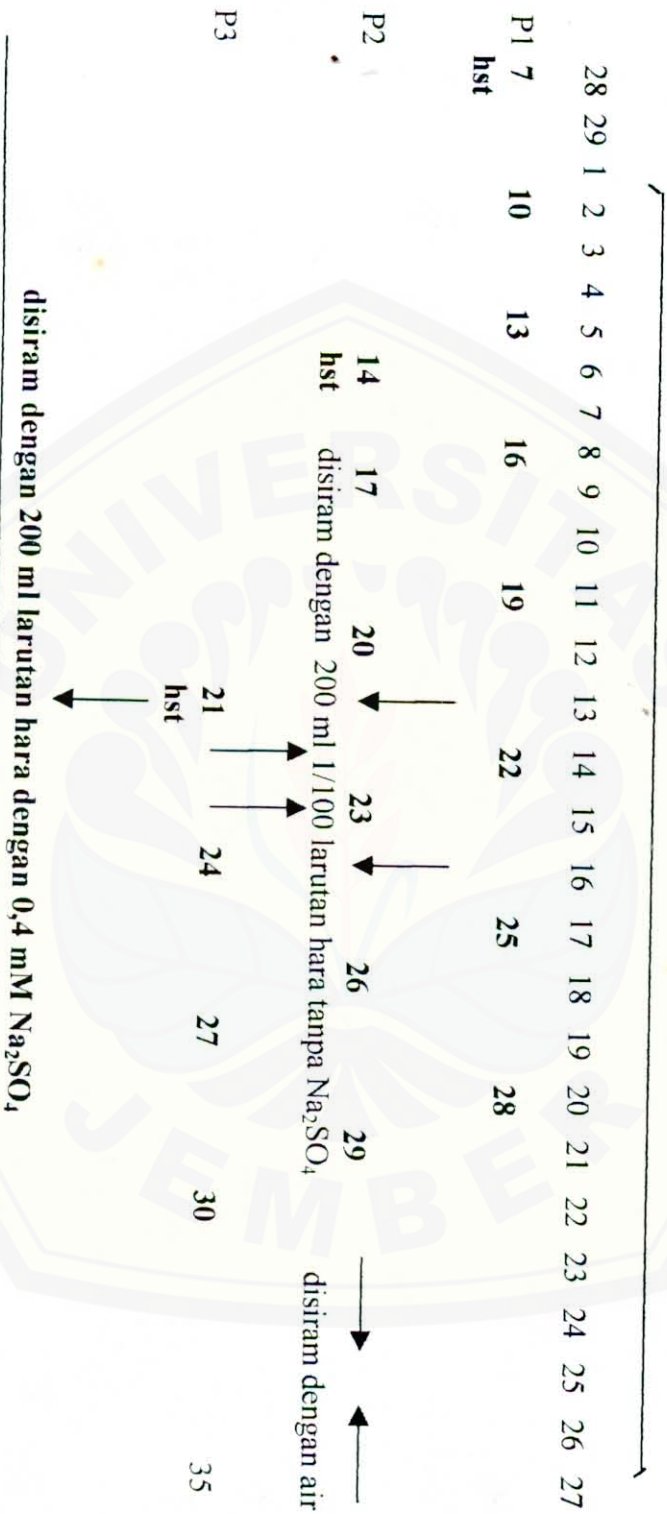
1. 1,47  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
2. 0,8  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
3. 0,64  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
4. 4,5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$
5. 0,7  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
6. 0,17  $\mu\text{M}$   $\text{CoSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
7. 0,01  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Sumber : Sexton *et al.* (1998)

Lampiran 2. Bagan Pelaksanaan Penelitian

Pebruari 2000

Maret 2000



setelah  
perkecambahan

perlakuan  
dihentikan

panen

- P1 = saat pemberian sulfur 7 hst
- P2 = saat pemberian sulfur 14 hst
- P3 = saat pemberian sulfur 21 hst