



**ANALISIS PROFIL PROTEIN DUA VARIETAS PADI  
AROMATIK (*Oryza sativa L.*) DENGAN BEBERAPA  
PERLAKUAN NITROGEN**

**SKRIPSI**

Oleh

**Intan Nirmalasari  
NIM 131510501284**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**ANALISIS PROFIL PROTEIN DUA VARIETAS PADI  
AROMATIK (*Oryza sativa L.*) DENGAN BEBERAPA  
PERLAKUAN NITROGEN**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan  
mencapai gelar Sarjana Pertanian

Oleh

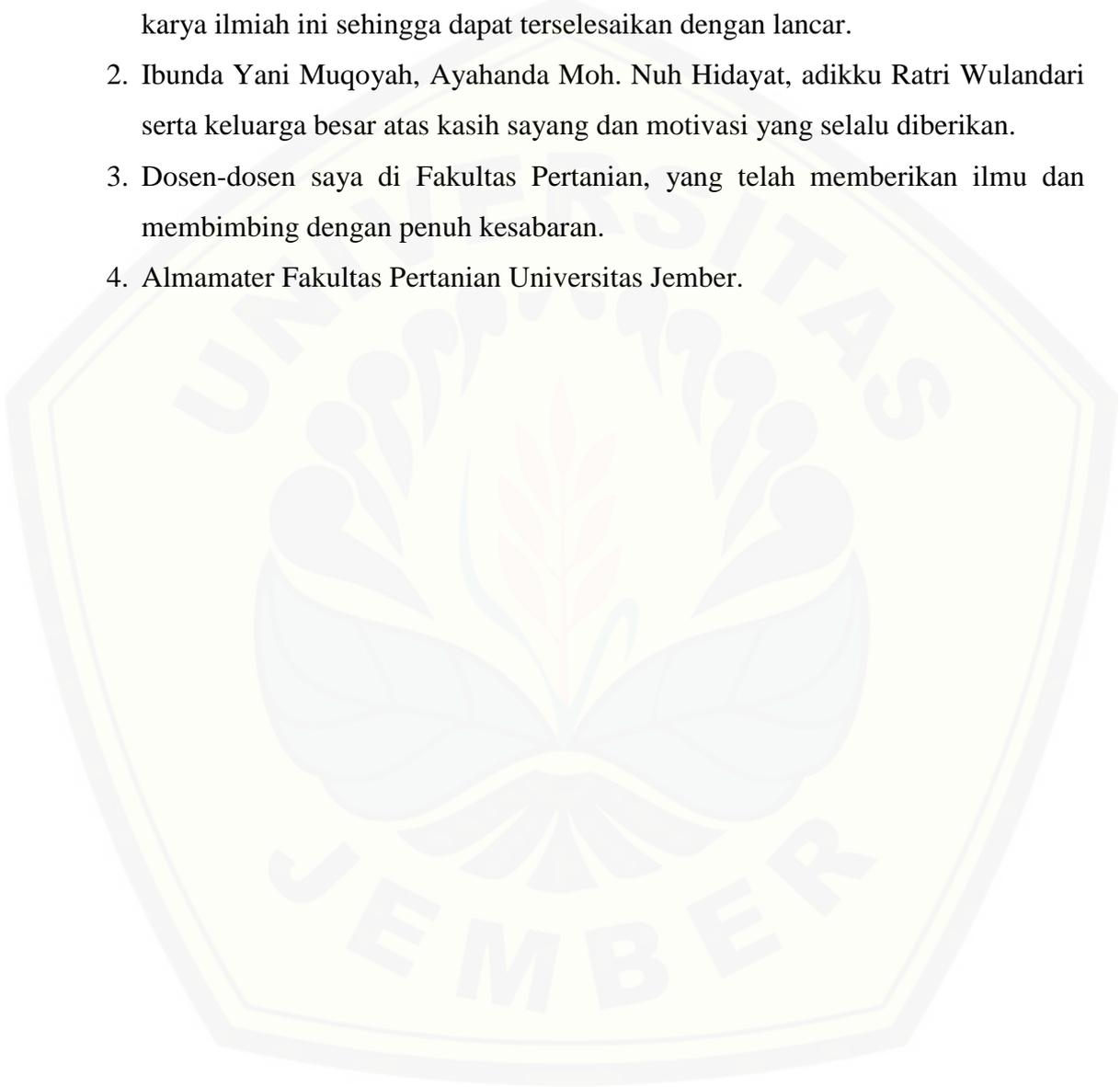
**Intan Nirmalasari  
NIM 131510501284**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT atas segala karunia ini dan limpahan rahmat dalam penyelesaian karya ilmiah ini sehingga dapat terselesaikan dengan lancar.
2. Ibunda Yani Muqoyah, Ayahanda Moh. Nuh Hidayat, adikku Ratri Wulandari serta keluarga besar atas kasih sayang dan motivasi yang selalu diberikan.
3. Dosen-dosen saya di Fakultas Pertanian, yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran.
4. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.



**MOTTO**

“Dan Kami pasti akan menguji kamu dengan sedikit ketakutan, kelaparan, kekurangan harta, jiwa dan buah-buahan. Dan sampaikanlah berita gembira kepada orang-orang yang bersabar”  
(QS Al Baqoroh : 155)

“Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan, maka apabila telah selesai dengan suatu urusan, kerjakanlah dengan sungguh-sungguh urusan yang lain.”  
(Q.S Al Insyirah : 6-8)

Imam Syafi’i Rodhiyallahu ‘anhu berkata :  
Saudaraku, engkau tidak akan mendapatkan ilmu kecuali dengan 6 hal, aku terangkan kepadamu dengan penjelasan, yaitu:  
kecerdasan, ketamakan terhadap ilmu, kesungguhan, mempunyai harta, bersahabat dengan guru dan waktu yang lama.

**جَرِّبْ وَلَا حِظَّ تَكُنْ عَارِفًا**

“Cobalah dan perhatikanlah, nicaya kamu akan jadi orang yang mengetahui.”  
(Experience is the best teacher)

**Top goal :**

“Allah akan mengangkat (derajat ) orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi pengetahuan beberapa derajat”  
(QS. Al Mujadalah : 11)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Intan Nirmalasari

NIM : 131510501284

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul **“Analisis Profil Protein Dua Varietas Padi Aromatik (*Oryza sativa L.*) dengan Beberapa Perlakuan Nitrogen”** 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 isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus saya junjung tinggi.

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

Jember, 7 Februari 2018

Yang menyatakan,

Intan Nirmalasari  
NIM. 131510501284

**SKRIPSI**

**ANALISIS PROFIL PROTEIN DUA VARIETAS PADI  
AROMATIK (*Oryza sativa* L.) DENGAN BEBERAPA  
PERLAKUAN NITROGEN**

Oleh

Intan Nirmalasari  
NIM 131510501284

**Pembimbing:**

Dosen Pembimbing Utama : Tri Handoyo, SP., M.Agr., Ph.D  
NIP. 197112021998021001

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “**Analisis Profil Protein Dua Varietas Padi Aromatik (*Oryza sativa. L*) dengan Beberapa Perlakuan Nitrogen**” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Rabu

Tanggal : 7 Februari 2018

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

**Dosen Pembimbing Utama,**

**Tri Handoyo, SP., M.Agr., Ph.D**  
**NIP. 197112021998021001**

**Dosen Penguji Utama,**

**Dosen Penguji Anggota,**

**Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D**  
**NIP. 197008101998031001**

**Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D**  
**NIP. 760015751**

**Mengesahkan**

**Dekan,**

**Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D.**  
**NIP. 196005061987021001**

## RINGKASAN

**Analisis Profil Protein Dua Varietas Padi Aromatik (*Oryza sativa L.*) dengan Beberapa Perlakuan Nitrogen;** Intan Nirmalasari; 131510501284; 2018; 36 halaman; Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Padi Aromatik (*Oryza sativa L.*) merupakan salah satu jenis padi yang memiliki kualitas baik, karena dapat mengeluarkan aroma seperti daun pandan. Padi Aromatik di Indonesia sebagian besar merupakan padi varietas lokal yang memiliki tingkat produksi rendah dari pada varietas padi non-aromatik. Peningkatan produksi padi salah satunya dipengaruhi oleh unsur Nitrogen berperan dalam meningkatkan pertumbuhan pada fase vegetatif. Kajian secara molekuler dapat dilakukan untuk mengidentifikasi proses biologis penyerapan N oleh beberapa varietas padi aromatik melalui analisis profil protein. Analisis profil protein bertujuan untuk mengidentifikasi level protein secara kuantitatif dan menggambarkan pola ekspresi pada level protein dari karakter-karakter yang berlawanan.

Pada penelitian ini akan dilakukan analisis profil protein dua varietas lokal padi aromatik, yaitu varietas Mentik Wangi dan Rojolele dengan perlakuan unsur hara Nitrogen melalui metode 2 D Electrophoresis. Berdasarkan hasil keseluruhan analisis pengamatan morfologi, fisiologi dan molekuler, maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi N yang memiliki pengaruh paling baik pada sebagian besar parameter pertumbuhan dari kedua varietas adalah konsentrasi N sedang, yaitu N2 (3.2 mM) dan N tinggi, yaitu (12.8 mM). Hal ini berkaitan erat dengan pola profil protein yang terbentuk. Pada Varietas Mentik Wangi, protein mayor memiliki ketebalan protein yang terus meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi N, kemudian menurun pada konsentrasi N tertinggi (N3). Sedangkan pada Varietas Rojolele, protein mayor (dominan) juga memiliki ketebalan protein yang terus meningkat hingga mencapai konsentrasi N tertinggi (N3). Jadi dapat disimpulkan bahwa konsentrasi N yang semakin meningkat dapat meningkatkan pertumbuhan dan menambah ketebalan pita atau spot protein mayor.

## SUMMARY

**Protein Profiles Analysis of Two Aromatic Rice Varieties (*Oryza sativa L.*) with Multiple Treatment of Nitrogen;** Intan Nirmalasari; 131510501284; 2018; 36 pages; Agrotechnology Study Program, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Aromatic rice (*Oryza sativa L.*) is one type of rice that has good quality, because it can remove the scent like pandan leaves. Aromatic rice in Indonesia is mostly local rice varieties that have low production levels than non-aromatic rice varieties. Increased rice production is influenced by one of the elements of Nitrogen play a role in improving growth in the vegetative phase. A molecular study can be performed to identify the biological process of N uptake by some aromatic rice varieties through protein profile analysis. The protein profile analysis aims to identify protein levels quantitatively and describes expression patterns at the protein level of opposing characters.

In this research will be analyzed protein profile of two local varieties of aromatic rice, namely Mentik Wangi and Rojolele varieties with Nitrogen nutrient treatment through 2 D Electrophoresis method. Based on the results of the overall analysis of morphological, physiological and molecular observations, it can be concluded that the N concentration which has the best influence on most growth parameters of the two varieties is the moderate N concentration, ie N2 (3.2 mM) and N high, ie (12.8 mM) . This is closely related to the pattern of protein profiles that are formed. In the Fragrant Mentik Varieties, major proteins have a steadily increasing protein thickness along with an increase in N concentration, then decrease at the highest N concentration (N3). While on the Rojolele variety, the major protein (dominant) also has a protein thickness that continues to increase until it reaches the highest N concentration (N3). So it can be concluded that the increasing N concentration can increase growth and increase the thickness of the ribbon or spot protein major.

## PRAKATA

Puji syukur saya haturkan pada kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan rahmat, serta hidayah-Nya atas terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis yang berjudul “**Analisis Profil Protein Dua Varietas Padi Aromatik (*Oryza sativa L.*) dengan Beberapa Perlakuan Nitrogen**” sebagai syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian.

Penyelesaian Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi) ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih atas semua dukungan dan bantuan kepada :

1. Dr. Ir. Sigit Soeparjono, MS, Ph.D., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember;
2. Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D, DIC., selaku Ketua Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember;
3. Ir. Sundahri, M.P. selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
4. Tri Handoyo, SP., M. Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, ilmu, pengalaman serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D dan Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D selaku Dosen Penguji yang memberikan bimbingan, pengarahan dalam penulisan, saran, dan masukan selama penyelesaian skripsi ini.
6. Nanang Tri Haryadi, SP., MSi. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan memberikan nasehat selama masa studi.
7. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M. Agr., Sc., selaku Kepala Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Science and Technology*) yang telah memberikan kesempatan berkarya, tempat belajar dan tempat penelitian.
8. Sahabat-sahabat saya di TH Team (Helti Anggiana Pratiwi, Nur Meili Zakiyah, Ari Istanti, Febby Mardhiana, Aidatun Nisa Firdaus, Siti Fatimatuz

Zahro, Dwi Putri Oktavia, Dini Regita, Yoko Simbolon, Yusuf Rachmandika).

9. Sahabat-sahabat saya di UKM F-SIAP (Forum Studi Islam Mahasiswa Pertanian) Deni Rahmawati, Halimatus Sakdiyah, Novida Nursyadarmawanti, Anisa Fitriani dan mbak Lindri Saputri yang selalu sabar menemani, memberikan nasehat dan memberikan kenangan indah. Serta adik-adik anggota F-SIAP yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, semoga senantiasa mendapat kemudahan dan petunjuk dalam menjalankan amanah dakwah ini.
10. Guru dan teman-teman ngaji saya yang selalu memotivasi dan mengingatkan agar berprinsip *tawazun*, tidak hanya sukses untuk perkara dunia, tapi juga akhirat.
11. Teman-teman, kakak-kakak dan adek-adek Rubin Salsabila dan Azmiya yang selalu memberikan canda tawa dan bantuannya.
12. Teman-teman seangkatan 2013 Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember yang telah banyak membantu penulis selama studi.
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang turut serta membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.

Karya Ilmiah Tertulis ini masih sangat jauh dari sempurna, oleh karena itu segala bentuk kritik dan saran untuk perbaikan karya ilmiah ini sangat penulis harapkan.

Jember, 7 Februari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN SAMPUL.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING .....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	ix
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Tanaman Padi Aromatik.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1 Klasifikasi Tanaman Padi Aromatik .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2 Biosintesis Senyawa Aromatik pada Padi Aromatik.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Asimilasi dan Peran Nitrogen pada Tanaman Padi .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Profil Protein dan Elektroforesis Dua Dimensi.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Hipotesis .....</b>	<b>11</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Bahan dan Alat.....</b>	<b>12</b>

3.3 Rancangan Percobaan .....	12
3.4 Pelaksanaan Penelitian .....	11
3.5 Parameter Pengamatan .....	17
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>17</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	19
4.2 Pembahasan .....	24
4.2.1 Pengaruh Konsentrasi N terhadap Parameter Morfologi dan Fisiologi Dua Varietas Padi Aromatik.....	29
4.2.2 Pengaruh Konsentrasi N terhadap Profil Protein Dua Varietas Padi Aromatik.....	31
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>36</b>
5.1 Kesimpulan .....	36
5.2 Saran .....	36
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>37</b>

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1.1	Perbandingan beberapa sifat morfologi dan fisiologi ras padi.....	5
4.1	Rangkuman analisis ragam semua variabel pengamatan.....	19
4.2	Ekspresi kelimpahan spot protein pada daun Padi Aromatik Varietas Mentik Wangi dengan 4 perlakuan N .....	26
4.3	Ekspresi kelimpahan spot protein pada daun Padi Aromatik Varietas Rojolele dengan 4 perlakuan N .....	27

DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
2.1	Jalur Biosintesis 2AP pada Kultivar Padi Aromatik (Hinge <i>et al</i> (2016).....	6
2.2	Gambar 2.2 Asimilasi Nitrogen menjadi Asam Amino (Hirel <i>et. al.</i> , 2010).....	7
2.3	Gambar 2.3 Tahapan dalam Metode Dua Dimensi Elektroforesis ( <a href="http://www.creative-proteomics.com">www.creative-proteomics.com</a> ).....	10
4.1	Tinggi tanaman Varietas Mentik Wangi dan Rojolele .....	20
4.2	Pengaruh konsentrasi N yang berbeda terhadap tinggi tanaman padi aromatik.....	20
4.3	Pengaruh konsentrasi N yang berbeda terhadap jumlah anakan padi aromatik.....	21
4.4	Berat segar Varietas Mentik Wangi dan Rojolele .....	21
4.5	Pengaruh konsentrasi N yang berbeda terhadap berat basah padi aromatik.....	22
4.6	Berat kering Varietas Mentik Wangi dan Rojolele.....	22
4.7	Pengaruh konsentrasi N yang berbeda terhadap berat kering padi aromatik.....	23
4.8	Kandungan klorofil total Varietas Mentik Wangi dan Rojolele.....	23
4.9	Pengaruh konsentrasi N yang berbeda terhadap Kandungan klorofil total padi aromatik.....	24
4.10	Perbedaan warna daun tanaman Padi Aromatik Varietas Mentik.....	24
4.11	Profil Protein dengan metode 2 Dimensi Elektroforesis pada Padi Aromatik Varietas Mentik Wangi setelah diberi Perlakuan Nitrogen.....	25
4.12	Profil Protein dengan metode 2 Dimensi Elektroforesis pada Padi Aromatik Varietas Rojolele setelah diberi Perlakuan Nitrogen.....	27
4.13	Rubisco Activase ( $\pm$ 42-45 kDa) dan Rubisco LSU ( $\pm$ 55 kDa).....	33

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Padi merupakan tanaman pangan utama sebagai sumber bahan pangan pokok yang dikonsumsi lebih dari dua per tiga penduduk dunia, khususnya di Asia Tenggara (Yang *et. al.*, 2013). Padi berperan penting untuk mencukupi kebutuhan nutrisi bagi sebagian besar penduduk dunia. Oleh karena itu, padi menjadi komoditas penting untuk mewujudkan ketahanan pangan lebih dari setengah penduduk dunia dan menjadi komoditas strategis di sebagian besar negara, baik negara maju maupun negara berkembang (FAO, 2006).

Kualitas jenis padi akan berpengaruh pada selera makan masyarakat. Secara umum masyarakat akan berusaha memilih kualitas jenis padi yang baik. Salah satu parameter yang menjadi tolok ukur pemilihan kualitas jenis padi adalah sifat aroma pada padi. Sifat aroma ini merupakan salah satu keunggulan jenis padi (Padmadi, 2009). Permintaan akan padi aromatik juga semakin meningkat akhir-akhir ini. Namun, selain sifat aroma, sifat agronomi lain seperti produktivitas, waktu tanam, ketahanan hama dan penyakit, kemudahan tanam, pemeliharaan dan lain sebagainya tidak sebaik padi non-aromatik. Hal ini menjadi kendala bagi petani untuk menanam padi aromatik, terutama pada masyarakat tradisional (Seno dkk., 2009).

Upaya peningkatan produksi padi aromatik terus dilakukan dengan memperhatikan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan hasil tanaman padi, salah satu faktor yang terpenting yaitu Nitrogen. Nitrogen adalah nutrisi yang banyak digunakan untuk memberikan dampak produksi yang signifikan bagi pertumbuhan tanaman dan digunakan dalam jumlah yang besar di antara semua jenis pupuk (Jacqueline *et. al.*, 2008). Nitrogen mempunyai peran penting bagi tanaman padi yaitu mempercepat pertumbuhan tanaman, memperbaiki tingkat hasil dan kualitas gabah melalui peningkatan jumlah anakan, pengembangan luas daun, pembentukan gabah, pengisian gabah, dan sintesis protein (Patti dkk., 2013). Sebagai unsur makro esensial, Nitrogen dibutuhkan untuk berbagai macam proses fisiologis. Terdiri dari 1,5 - 2% dari bahan kering tanaman dan berkisar

16% dari total protein. Untuk padi, N pada daun sekitar 75% dari total N yang dihubungkan dengan kloroplas, yang mana secara fisiologi hal tersebut sangat penting untuk memproduksi bahan kering melalui fotosintesis (Song *et. al.*, 2010).

Masalah yang terpenting dalam peningkatan pertumbuhan dan hasil tanaman padi adalah bagaimana meningkatkan penyerapan N pada setiap tahap pertumbuhan. Kebutuhan N dan pola penyerapan padi berbeda-beda di antara berbagai varietas dan ekosistem, sehingga identifikasi perbedaan varietas padi dan tahap kritis dari pertumbuhan varietas tersebut sangatlah perlu dilakukan untuk mengetahui efisiensi penyerapan N (Jacqueline *et. al.*, 2008). Perbedaan karakter antara padi kultivar lokal dan unggul salah satunya diperlihatkan oleh perbedaan tanggap kultivar tersebut terhadap kondisi hara, salah satunya yaitu hara N. Varietas unggul padi memiliki respon tinggi terhadap nitrogen, sedangkan varietas lokal sebaliknya (Mildaerizanti dkk., 2013).

Pendekatan berbasis proteomik digunakan dalam penelitian ini untuk menguji metabolisme N sebagai perangkat yang efektif. Dua Dimensi Elektroforesis dapat menjadi solusi keterbatasan yang dihadapi dalam analisis DNA/RNA karena modifikasi post-translasi. Proteomik melibatkan sistem analisis protein yang diekspresikan oleh genom pada organel, sel, organ atau jaringan. Perbandingan profil protein di bawah perbedaan kondisi fisiologis dapat memberikan bukti untuk beragam proses penting yang meliputi asimilasi N pada beberapa genotipe tanaman (Hakeem *et. al.*, 2012).

Oleh karena itu, Pada penelitian ini akan dilakukan analisis profil protein dua varietas lokal padi aromatik, yaitu varietas Mentik Wangi dan Rojolele dengan perlakuan Nitrogen melalui metode 2 Dimensi Electrophoresis. Penelitian ini akan bermanfaat untuk mengidentifikasi protein yang merespon terhadap perbedaan konsentrasi pemupukan N, yang mana akan memberikan pemahaman yang baik dari efisiensi penggunaan N dan pengembangan strategi baru untuk meningkatkan efisiensi N pada tanaman padi.

## 1.2 Perumusan Masalah

Adapun rumusan masalah berdasarkan uraian di atas, yaitu:

1. Bagaimana respon pertumbuhan varietas padi aromatik Mentik Wangi dan Rojolele setelah diberi perlakuan N ?
2. Bagaimana perbedaan profil protein antara padi aromatik Varietas Mentik Wangi dan padi aromatik Varietas Rojolele setelah diberi beberapa perlakuan Nitrogen ?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui respon pertumbuhan varietas padi aromatik Mentik Wangi dan Rojolele setelah diberi perlakuan N.
2. Mengetahui perbedaan profil protein antara varietas padi aromatik Mentik Wangi dan Rojolele setelah diberi beberapa perlakuan N

## 1.4 Manfaat

Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi konsentrasi N dan varietas yang baik dalam budidaya tanaman padi aromatik dengan mengetahui faktor pertumbuhan dan pola protein yang terbentuk.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Padi Aromatik

#### 2.1.1 Klasifikasi Tanaman Padi Aromatik

Menurut Tjitrosoepomo (1923), tanaman padi (*Oryza sativa* L.) diklasifikasikan dalam Divisi Spermatophyta, Sub Divisi Angiospermae, Class Monocotyledone, Ordo Poales/Glumiflorae, Famili Graminae, Genus *Oryza*, dan Spesies *Oryza sativa*. *Oryza sativa* L merupakan salah satu spesies yang dibudidayakan di Asia sedangkan *Oryza glaberrima* steund adalah salah satu yang dibudidayakan di Afrika (Manurung dan Ismunadi 1999). Lu dan Chang (1980) menyimpulkan hasil pengamatannya bahwa *Oryza sativa* dan *Oryza glaberrima* berasal dari leluhur yang sama, yaitu *Oryza perennis* Moench. Proses evolusi kedua spesies tersebut berkembang menjadi tiga ras ekogeografik, yaitu Indika, Japonika, dan Javanika. Masing-masing ras memiliki beberapa varietas, di antaranya: (1) varietas Cisadane, Gajah Mungkur, Membramo, dan IR64 termasuk ke dalam ras Indika, (2) varietas Nipponbare, Tsukinohikari, Asonohikari, dan Koshikari termasuk ke dalam ras Japonika, (3) varietas Rojolele, Ciherang, dan Pandan Wangi termasuk ke dalam ras Javanika.

Beberapa peneliti menggolongkan *javanica* ke dalam taksonomi yang sama dengan ras *japonica*. Glaszmann (1987) mengklasifikasikan 95% kultivar padi ke dalam 6 grup, sedangkan 5% sisanya disebar ke dalam posisi intermediet. Grup I termasuk ke dalam *Indica* dan Grup VI termasuk dalam *Japonica* dan *Javanica*. Kultivar aromatik banyak dimiliki oleh Grup V yang memiliki kultivar populer di dunia dan memiliki kualitas tinggi yaitu Padi Basmati dari India dan Pakistan dan beberapa kultivar lainnya. Kultivar padi aromatik asli Indonesia yang termasuk ke dalam Grup VI (*Japonica*) yaitu Rojolele, Mentik Wangi dan Sukamandi (Glaszmann,1987). Secara umum sifat-sifat padi tersebut berbeda pada setiap rasnya. Perbedaan tersebut meliputi warna daun, gabah, jumlah anakan, jaringan batang, kerontokan, serta kandungan amilosa. Perbedaan ketiga ras tersebut dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 2.1 Perbandingan beberapa sifat morfologi dan fisiologi ras padi

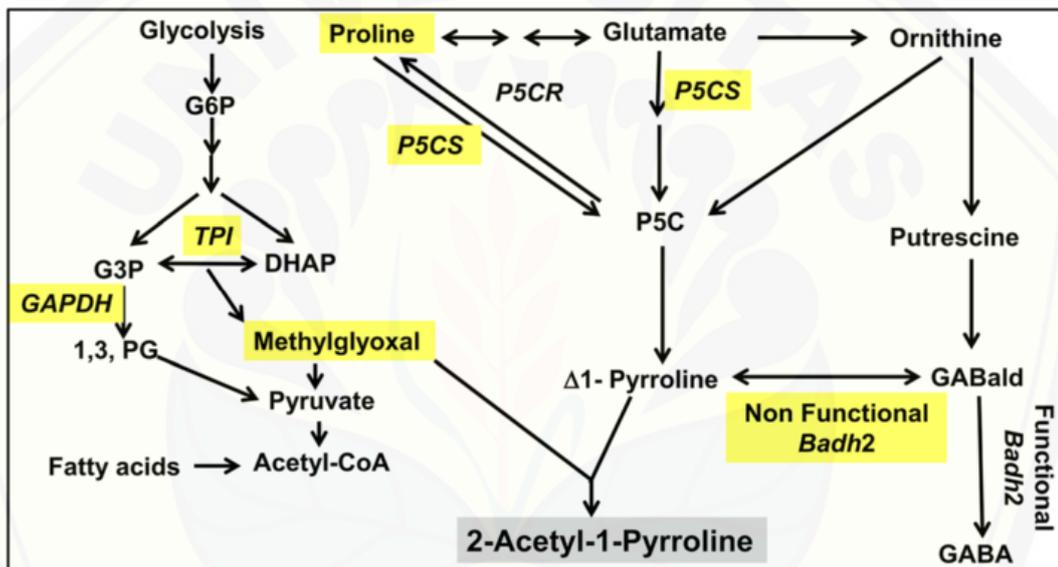
Komponen	Indika	Japonika	Javanika
Daun	Lebar, hijau	Sempit, hijau tua	Lebar, hijau muda
Gabah	Pendek, pipih	Pendek, bulat	Panjang, lebar,
Anakan Jaringan	Banyak Lunak	Sedang Keras	Sedikit Keras
Batang	Sedang-tinggi	Sedang-pendek	Tinggi
Kerontokan	Mudah rontok	Sedikit rontok	Sedikit rontok
Amilosa	23-31%	10-24 %	20-25%

Sumber : Padmadi (2009)

### 2.1.2 Biosintesis Senyawa Aromatik pada Tanaman Padi Aromatik

Padi Aromatik mengandung beberapa senyawa biokimia, tetapi salah satu senyawa yang paling signifikan telah diidentifikasi sebagai 2-acetyl-1-pyrroline (2AP). Senyawa tersebut memberikan aroma seperti popcorn atau pandan (*Pandanus amaryllifolius*). Aroma seperti pandan membuat padi aromatic memiliki daya tarik tinggi pada beberapa Negara tertentu (Napasintuwong, 2012). Padi aromatik memiliki aroma khas yang disebabkan oleh senyawa volatil 2 *acetyl-1-pyrroline* (2AP), yang juga ditemukan pada bagian kalus dan organ vegetatif tanaman padi (Yoshihashi *et al.* 2002). 2-Acetyl-1-pyrroline (2-AP) adalah odouran kuat yang memiliki aroma wangi seperti pandan atau popcorn. Aroma wangi pandan ini mudah dikenali dari aroma nasi, beras atau bahkan pada pertanaman padi aromatik saat berbunga. Senyawa wangi ini secara alami disintesis oleh tanaman padi aromatik, akan tetapi tidak disintesis oleh tanaman padi non-aromatik. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa padi aromatik sebenarnya merupakan padi non-aromatik yang mengalami mutasi pada kromosom tertentu. Mutasi kromosom tersebut mengakibatkan enzim BADH2 (betaine aldehyde dehydrogenase 2) dalam tanaman padi menjadi tidak berfungsi (tidak aktif) sehingga beras aromatik mengandung senyawa 2-AP (Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, 2015).

Terdapat dua mekanisme akumulasi 2AP pada biji yang masak. Pada salah satu mekanisme, 2AP disintesis di daun dan selubung batang dan ditransportasikan ke biji yang masak. Seperti yang lain, proline ditranslokasi dari daun ke dalam bulir padi dan sintesis 2AP terjadi dalam bulir padi (Hinge *et al.*, 2016). Romanczyk *et. al* (1995) menyebutkan bahwa terjadi peningkatan kandungan 2AP pada budidaya tanaman *B. Cereus* ketika diberi prolin, ornithin dan glutamate. Kandungan prolin tidak terpengaruh secara signifikan pada bulir padi akibat salinitas atau tekanan kekeringan, meskipun bulir padi mengandung jumlah 2AP yang jauh lebih tinggi (Yoshihashi *et al.* 2002).



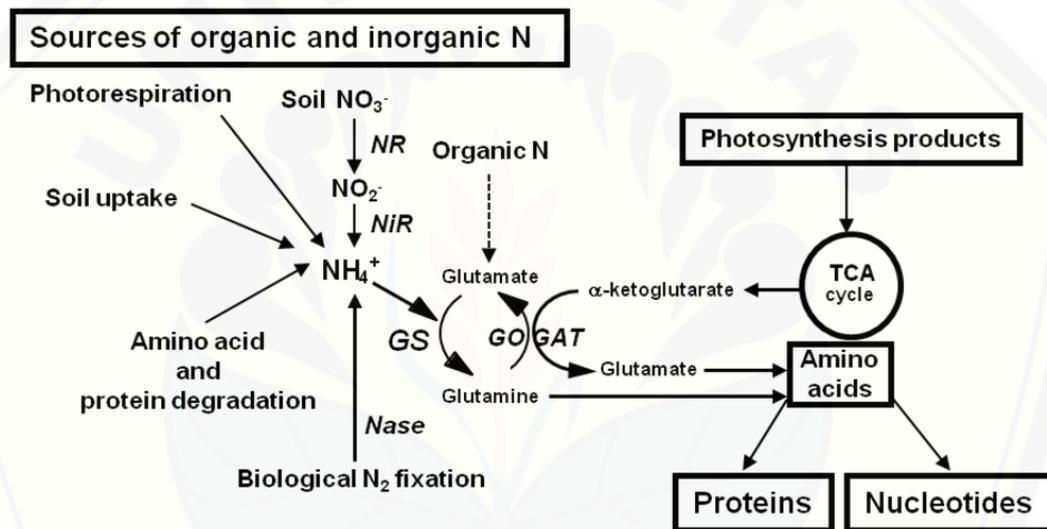
Gambar 2.1 Jalur Biosintesis 2AP pada Kultivar Padi Aromatik (Hinge *et. al* (2016)

## 2.2 Asimilasi dan Peran Nitrogen Pada Tanaman Padi

Nitrogen mempunyai peranan penting bagi tanaman padi, yaitu mendorong pertumbuhan tanaman yang cepat dan memperbaiki tingkat hasil dan kualitas gabah melalui peningkatan jumlah anakan, pengembangan luas daun, pembentukan gabah, pengisian gabah, dan sintesis protein. Tanaman padi yang kekurangan Nitrogen anakannya sedikit dan pertumbuhannya kerdil. Daun berwarna hijau kekuning-kuningan dan mulai mati dari ujung kemudian menjalar ke tengah helai daun. Sedangkan jika Nitrogen diberikan berlebih akan

mengakibatkan kerugian yaitu melunakkan jerami dan menyebabkan tanaman mudah rebah dan menurunkan kualitas hasil tanaman (Patty dkk., 2013).

Bahan tanaman kering pada umumnya mengandung unsur N antara satu dan empat persen, sedangkan tanaman polongan memiliki kandungan unsur N sedikit lebih tinggi yaitu sekitar lima persen. Pada tanaman hijau, protein N adalah sejauh ini adalah fraksi N yang terbesar (Hofman and Cleemput, 2004). Unsur nitrogen juga berperan sebagai penyusun untuk proses fotosintesis tanaman dan fotosintat yang dihasilkan. Fotosintat ini berupa karbohidrat sederhana dalam bentuk monosakarida seperti glukosa dan fruktosa (Pahlevi dkk., 2016).



Gambar 2.2 Asimilasi Nitrogen menjadi Asam Amino (Hirel *et. al.*, 2010)

Bentuk utama N-anorganik dalam tanah adalah berupa amonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). Dalam kondisi tanah reduktif seperti tanah sawah, amonium adalah bentuk dominan dari N-anorganik yang dapat diserap tanaman. Di sisi lain, nitrat adalah N-anorganik utama di tanah dengan aerasi baik dari tanah pertanian dan ekosistem alam. Bentuk serapan N yang disukai tanaman tergantung pada kondisi tanah dan jenis tanaman. penyerapan amonium dapat menurunkan pH, sementara penyerapan nitrat dapat meningkatkan pH. Oleh karena itu, campuran ammonium dan nitrat dapat menstabilkan pH larutan (Ohyama, 2010).

Tanaman dapat menggunakan Nitrogen dalam bentuk anorganik ( $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), tetapi yang bentuk dibutuhkan adalah dalam bentuk reduksi berupa  $\text{NH}_4^+$ .

$\text{NH}_4^+$  (ammonium) diasimilasi di dalam organ tanaman (daun) untuk mendapatkan N-organik yang kemudian akan diubah menjadi glutamate. Glutamate merupakan golongan dari asam amino yang kemudian diperbanyak jumlahnya dan membentuk molekul protein. Oleh karena itu, kandungan asam amino daun dapat ditingkatkan dengan meningkatkan pemberian Nitrogen selama masa pertumbuhan tanaman (Hoffman and Clempet, 2004).

## 2.3 Profil Protein dan Elektroforesis Dua Dimensi

### 2.3.1 Profil Protein

Protein adalah ekspresi dari gen, karakter fenotip sebagai hasil interaksi antara faktor genotip dan lingkungan (Brock *et. al.*, 1992). Sunarto (2011) menyatakan bahwa protein dapat digunakan sebagai ciri genetik untuk mempelajari keragaman individu dalam satu populasi. Protein merupakan salah satu makro-molekul yang paling penting dari organisme hidup dan merupakan komponen utama dari jalur metabolisme fisiologis sel. Enzim, transporter dan komponen struktural sel merupakan bagian dari protein. Ada ribuan enzim yang mengkatalisis reaksi metabolisme tertentu dalam sel untuk mempertahankan hidup dan pertumbuhan di bawah berbagai keadaan lingkungan (Ohyama, 2010). Untuk mengetahui aktivitas molekuler yang dilakukan oleh komponen tubuh makhluk hidup, maka dapat dilakukan dengan mengetahui aktivitas protein melalui analisis profil protein.

Profil protein merupakan bagian khusus dari studi proteomik yang merupakan studi skala besar protein, khususnya struktur dan fungsi. Analisis proteomik pertama kali dilakukan dengan menganalisis semua protein yang ada di dalam sel, jaringan atau organisme pada waktu tertentu atau dalam keadaan tertentu. Pada tahun 1997, Wilkins menciptakan istilah "proteomik" yang merupakan gabungan kata dari "protein" dan "genom" (Wilkins *et al.*, 1998). Tujuan pokok studi proteomik tidak hanya mengidentifikasi semua protein dalam sel, tetapi juga mengidentifikasi hubungan antara sekuen genetik dengan struktur protein. Lingkup kerja pada studi proteomik meliputi investigasi interaksi protein, hubungan di antara struktur protein dan fungsinya, proses selular dan jaringan,

serta untuk mengembangkan teknik pemisahan protein dan profil protein. Profil protein muncul secara independen dan menjadi bagian khusus dari proteomik (Mohamed *et. al.*, 2011).

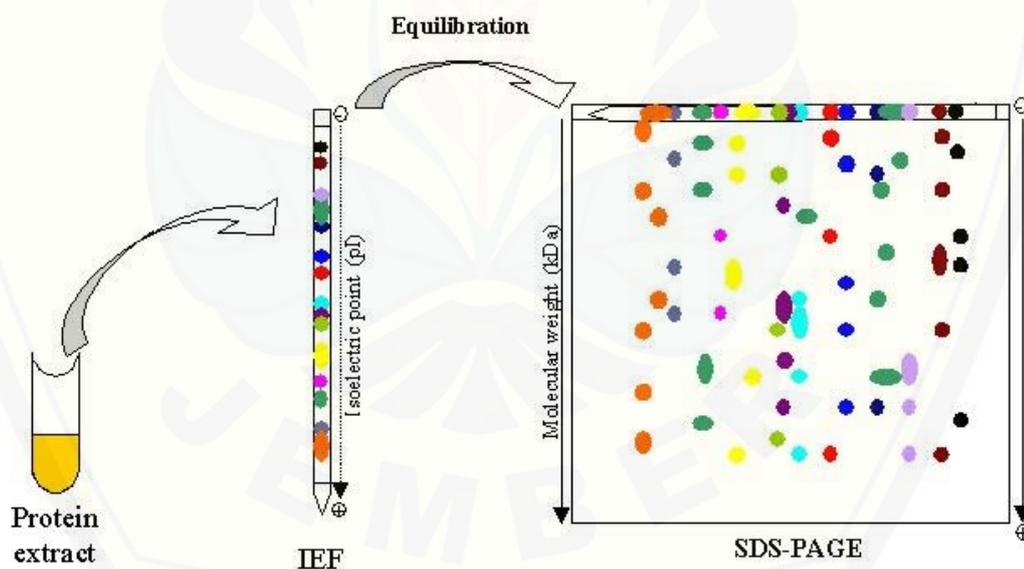
Analisis profil protein bertujuan untuk memberikan informasi yang belum pernah terjadi sebelumnya dalam peristiwa biologis. Hasil kuantitatif dari tingkat protein dapat dicapai dengan profil protein, yang menunjukkan pola ekspresi unik pada level protein ketika satu tipe sel protein dibandingkan dengan tipe sel protein lainnya. Nilai profil protein dapat meningkat setiap hari karena dipengaruhi oleh keadaan dan waktu. Alasan penting dilakukannya analisis profil protein adalah kekuatannya untuk menganalisis modifikasi protein. Partikel sel tertentu kemungkinan dapat dibedakan dengan set protein pada berbagai waktu atau dalam berbagai kondisi, meskipun setiap protein tertentu dapat melalui berbagai perubahan dikenal sebagai post-translasimodifikasi, yang akan memiliki efek penting terhadap fungsinya (Mohamed *et. al.*, 2011). Beberapa studi telah dilakukan dengan membangun proteomik untuk sampel yang kompleks dari padi, seperti daun, embrio, endosperm, akar, batang, akar, dan kalus (Komatsu and Tanaka, 2004).

## 2.2.2 Elektroforesis Dua Dimensi

Elektroforesis merupakan salah satu teknik dalam bioteknologi yang digunakan untuk analisis protein, DNA pada berbagai cairan biologis (serum, urin, CSF). Teknik ini merupakan teknik yang menggunakan elektroforesis zona (Jean and Francois, 2010). Prinsip kerja elektroforesis dimulai saat makromolekul yang bermuatan listrik ditempatkan pada medium yang berisi tenaga listrik. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif dan kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya (Magdeldin, 2012). Molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda) (Klug and Cummings, 1994).

Terdapat dua pendekatan yang umumnya digunakan untuk menganalisis protein yaitu dua dimensi elektroforesis. Dua Dimensi Elektroforesis adalah

metode yang kuat dan telah digunakan secara meluas untuk analisis campuran yang kompleks dari protein yang diekstraksi dari sel, jaringan atau sampel biologi lainnya. Teknik ini memisahkan protein menurut dua sifat independen dalam dua langkah yang berlainan. Tahap Dimensi 1 yaitu Iso Electric Focusing (IEF) memisahkan protein menurut titik isoelektriknya. Sedangkan Tahap Dimensi 2 yaitu Sodium Dodecyl Polyacrilamid Gel Electrophoresis (SDS PAGE) memisahkan protein menurut berat molekulnya ( $M$  massa molekul relative). Setiap spot pada dua dimensi gel berpotensi sesuai dengan jenis protein tunggal pada sampel. Ribuan protein yang berbeda dapat dipisahkan, dan informasi seperti protein  $pI$ , berat molekul yang tampak dan jumlah tiap protein dapat diperoleh. Langkah-langkah yang dilakukan dalam 2-D Electroforesis yaitu ekstraksi protein, Dimesi 1 Electroforesis, Dimensi 2 Electroforesis, pewarnaan atau visualisasi gel, scanning gel dan analisis gel menggunakan software gel analyzer (GE Healthcare, 2004).



Gambar 2.3 Tahapan dalam Metode Dua Dimensi Elektroforesis ([www.creative-proteomics.com](http://www.creative-proteomics.com))

Menurut Farrel (1975), 2 Dimensi Elektroforesis memisahkan protein berdasarkan dua parameter independen parameter, yaitu isoelectric point ( $pI$ ) pada dimensi pertama dan berat molekul ( $M_r$ ) pada dimensi kedua dengan memasang teknik isoelectric focusing (IEF) dan sodium dodecyl sulfate

polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Protein yang terpisah pada 2D gel divisualisasi baik dengan pewarnaan Coomassie blue dye, silver stain, fluorescent dyes, immunological detection atau dengan radiolabelling dan quantifikasi menggunakan densitometer, fluoro dan atau phosphor imagers. Secara teoritis, 2DE mampu memisahkan 10.000 protein secara simultan, dengan perkiraan 2000 protein yang dideteksi dan dikuantifikasi jumlahnya kurang dari 1 ng per spot.

## **2.4 Hipotesis**

1. Analisis profil protein varietas Mentik Wangi dan Rojolele dengan perlakuan Nitrogen memiliki respon pertumbuhan yang berbeda.
2. Analisis profil protein varietas Mentik Wangi dan Rojolele dengan perlakuan Nitrogen memiliki profil protein yang berbeda.

## BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Green House dan Laboratorium Divisi Bioteknologi dan Biomolekular CDAST (*Center for Development of Advance Science and Technology*) Universitas Jember mulai bulan Juli hingga September 2017.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tray penyemaian, alat penyiram, gunting, cawan petri, mortar, tabung reaksi, sentrifuge, mikropipet, alat elektroforesis, gel scanner, gel analyzer, mini protean, spektrofotometer dan cuvet.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Benih padi aromatik Varietas Mentik Wangi dan Varietas Rojolele yang diperoleh dari Balai Penelitian Padi Sukamandi, Nutrisi Hoagland, pasir, polybag, aquades, etanol, buffer fenol ekstraksi, PVP, sea sand, LDS Sampel buffer, sample reducing agent, IEF strip gel dan SDS PAGE gel.

### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Penelitian, Perlakuan dan Ulangan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL) dengan 2 faktor dan 4 ulangan. Faktor pertama yaitu Varietas dan faktor kedua yaitu Konsentrasi Nitrogen.

Faktor Varietas :

(I) V1 : Varietas Mentik Wangi

(II) V2 : Varietas Rojolele

Faktor Konsentrasi Nitrogen :

(I) N0 : 0,4 mM Ammonium

(II) N1 : 0,8 mM Ammonium

(III) N2 : 3,2 mM Ammonium

(IV) N3 : 12,8 mM Ammonium

Adapun kombinasi perlakuan antara Varietas Padi Aromatik dan konsentrasi Nitrogen, yaitu :

V1N3	V2N1	V2N2	V1N2
V1N1	V2N2	V2N1	V1N1
V2N4	V1N3	V1N4	V2N4
V2N2	V1N2	V1N2	V1N4
V2N1	V1N1	V2N3	V1N3
V2N3	V2N3	V1N4	V2N4

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila antar perlakuan terdapat perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji beda nyata DMRT dengan taraf kepercayaan 95%.

### 3.3.2 Tahapan Penelitian

#### 1. Penanaman

Benih padi aromatik sebanyak  $\pm 25$  benih untuk tiap varietas direndam menggunakan air bersih dan fungisida selama 3 hari (hingga pecah kecambah). Benih ditanam menggunakan media tanah dan pasir pada pot tray yang digenangi larutan nutrisi di bawahnya. Setelah bibit tumbuh cukup kuat dan seragam, bibit dipindah tanam ke media rockwool pada umur 11 hari setelah penyemaian. Setelah itu ditanam secara hidroponik menggunakan bak kecil berukuran 20 x 10 cm untuk 4 tanaman. Sistem hidroponik tersebut juga dilengkapi dengan aerator untuk memperlancar difusi oksigen dari udara ke akar tanaman.

#### 2. Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan dengan pemberian nutrisi secara rutin, pengaturan pH dan pemberantasan OPT. Nutrisi yang diberikan adalah nutrisi growmore sebanyak  $\pm 1$  gram, lalu dilarutkan pada 1 liter air dan pH larutan dipertahankan berkisar 5,5 – 6,5. Pemberantasan OPT dilakukan dengan menyemprot fungisida ketika ada gejala serangan muncul dan pemberantasan secara mekanik.

### 3. Aplikasi Nitrogen sesuai Perlakuan

Aplikasi Nitrogen dilakukan setelah tanaman padi berumur 28 hari setelah penyemaian. Pemberian nutrisi padi aromatik dilakukan dengan menggunakan nutrisi Hoagland yang diciptakan oleh D.R. Hoagland dan D.I. Arnon untuk metode penanaman tanaman dengan kultur air tanpa tanah. Nutrisi Hoagland dan Arnold terdiri atas unsur hara makro dan mikro. Unsur hara makro dan mikro dibuat menjadi 5 stok larutan, yaitu :

- Larutan 1 : 50,6 gram  $\text{KNO}_3$  dan 35,5 gram  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  dalam 1 liter air  
26,63 gram  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dalam 1 liter air
- Larutan 2 : 37,3 gram  $\text{KCl}$  dalam 200 ml air
- Larutan 3 : 22,1 gram  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dalam 100 ml air
- Larutan 4 : 24,7 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dalam 100 ml air
- Larutan 5 : 15,6 gram  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; 12 mg Fe-EDTA; 7 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  dalam 100 ml air.

Berikut ini merupakan kebutuhan larutan Hara Hoagland dan Arnold dalam 1 liter larutan (mM), dan untuk tiap stok larutan dibutuhkan (ml) :

Larutan	0,4 mM	0,8 mM	3,2 mM	12,8 mM
1	0,4	0,8	3,2	12,8
2	3,95	3,9	3,6	2,4
3	2	1,95	1,8	1,2
4	2	2	2	2
5	2	2	2	2

Setelah masing-masing larutan induk ditambahkan pada setiap liter larutan hara, kemudian pH diatur hingga mencapai 5,5 – 6,5 dengan menambahkan HCl.

### 4. Pengambilan Sampel Daun

Sampel daun tanaman padi aromatik yang diambil untuk analisis profil protein dilakukan berdasarkan metode Pawirosemadi (1980) yaitu daun lingkaran pertama yang tampak siku daunnya dan telah berkembang penuh dihitung dari ujung batang tanaman padi. Tanaman padi diambil daunnya pada hari ke 10 setelah perlakuan N dan pemanenan daun dilakukan pada pukul 11.00 siang.

## 5. Ekstraksi Protein Sampel pada Daun

Metode yang digunakan untuk ekstraksi protein sampel adalah metode fenol ekstraksi berdasarkan penelitian Song *et. al* (2011). Daun padi aromatik diambil sebanyak 0,4 gram, lalu dihaluskan menggunakan mortar dan pestle, kemudian dibekukan dengan nitrogen cair dan ditambahkan PVP sebanyak 30 mg. Sampel yang telah ditumbuk halus ditambahkan dengan Tris saturated fenol sebanyak 1 ml dan buffer ekstraksi dingin suhu dengan 4<sup>0</sup>C [0,7 M Sucrose; 0,1 M KCl; 0,5 M tris-HCl, pH 7,5 dan 50 mM EDTA, 1% w/v DTT, dan pH dijadikan 7,5] sebanyak 1 ml. Sampel yang telah homogen dimasukkan ke dalam eppendorf 2 ml dan disentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Fase fenolik yang berada di atas dan berwarna hijau pekat diambil dan dimasukkan ke eppendorf baru, sedangkan fase air yang ada di bawahnya dibuang. Setelah itu ditambahkan buffer ekstraksi ke dalam fase fenolik sebanyak 1 ml, lalu disentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Fase fenolik yang berada di atas dan berwarna hijau pekat diambil dan dimasukkan ke eppendorf baru, sedangkan fase air yang ada di bawahnya dibuang. Kemudian ditambahkan Ammonium acetate dingin dalam methanol ke dalam fase fenolik sebanyak 1 ml, lalu kocok hingga homogen dan terdapat serabut putih pada suspensi tersebut yang mengindikasikan adanya protein. Sampel inkubasi selama semalam pada suhu – 20<sup>0</sup>C.

Sampel yang telah diinkubasi kemudian disentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Supernatan dibuang dan pellet yang berwarna putih dicuci secara berturut-turut (3 kali) menggunakan Ammonium acetate dalam methanol, Methanol dan Aceton masing-masing sebanyak 1 ml dengan cara divortex dan disentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Setelah pellet tercuci bersih dengan indikasi warna pellet putih, maka pellet dikeringkan menggunakan evaporator pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 25 menit. Sampel disimpan pada suhu -80<sup>0</sup>C hingga digunakan untuk analisis profil protein. Sebelum dilakukan analisis 2 Dimensi Elektroforesis, dilakukan pengukuran kadar protein terlarut pada sampel dengan metode Bradford.

## 6. Analisis Profil Protein dengan 2D-Elektroforesis

Tahapan yang dilakukan dalam 2 Dimensi Elektroforesis berdasarkan metode Novex (2012) terdiri atas :

### 1) Rehidrasi Strip Gel

Sampel protein dalam eppendorf dilarutkan menggunakan buffer rehidrasi [8 M Urea; 2% CHAPS; 0,05% v/v ZOOM Carrier Ampholytes dan 0,002% Bromophenol Blue] sebanyak 150 µl. Setelah itu disonikasi hingga protein larut dalam buffer rehidrasi, kemudian divortex dan disentrifuge dengan 10000 rpm selama 5 menit pada 4<sup>0</sup>C. Supernatan diambil sebanyak 140 µl dan dimasukkan ke dalam IPG Runner Cassete melalui sumuran. Strip Gel dimasukkan ke dalam IPG Runner Cassete melalui sumuran dengan kutub + berada didasar dan kutub – berada di atas serta sisi yang tercetak menghadap bawah. Sumuran disegel dengan selotip hingga tertutup rapat, lalu diinkubasi selama 1-3 jam pada suhu ruang.

### 2) Isoelectro Focusing (IEF) : First Dimension Electrophoresis

Setelah direhidrasi, IPG Runner Cassete yang berisi Strip Gel dimasukkan ke dalam mini chamber IPG Runner secara vertikal dan diposisikan dengan benar dengan perangkat lainnya. Kemudian ditambahkan aquades sebanyak 600 ml ke dalam mini chamber, lalu chamber ditutup rapat dan dihubungkan dengan power supply 1000 PAC dan dialiri arus listrik dengan tegangan :

200 V selama 20 menit

450 V selama 15 menit

750 V selama 15 menit

950 V selama 180 menit

Setelah waktu IEF berakhir, kemudian IEF strip gel disimpan pada suhu - 80<sup>0</sup>C hingga digunakan untuk running pada Second Dimension Electrophoresis.

### 3) Equilibrasi Strip Gel

Sebelum dilanjutkan ke dimensi kedua, Strip Gel diequilibrasi pada tray equilibrasi menggunakan 1 x LDS Sampel Buffer sebanyak 1 ml, kemudian diinkubasi dengan digoyang-goyang selama 15 menit lalu dibuang, langkah ini diulang sebanyak 3 kali. Pada pengulangan terakhir ditambahkan sampel reducing

agent sebanyak 200µl, kemudian dibuang. Setelah itu ditambahkan SDS Sampel buffer 200 µl. IEF strip gel siap dirunning dengan SDS PAGE.

#### 4) Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) : Second Dimension Electrophoresis

Konsentrasi lower gel yang digunakan yaitu 15% dan cetakan sumuran pada upper gel hanya dibuat 2 cetakan yaitu untuk marker dan 1 strip gel dengan posisi horizontal. Strip gel dimasukkan ke dalam sumuran dengan posisi katoda berdekatan dengan anion (-) atau anion (-) adalah disebelah kanan dan kation (+) ada di sebelah kiri. Marker sebanyak 5µl dimasukkan pada sumuran marker, kemudian SDS PAGE Runner dihubungkan dengan power supply pada dengan tegangan 30 V selama 1 jam dan 100 V selama 3-4 jam.

#### 5) Staining dan Analisis Gel SDS PAGE

Gel SDS PAGE kemudian dicat menggunakan pewarna CBB (*Comassie Brilliant Blue*) dengan inkubasi dalam shaker selama semalam. Setelah band atau pita protein terlihat jelas, maka gel di destaining menggunakan Methanol dan Asam Acetat selama 3 jam hingga warna gel menjadi biru terang. Setelah itu gel divisualisasi dengan di scan menggunakan mesin scanner manual yang terhubung komputer. Gambar hasil 2 Dimensi Elektroforesis dianalisis menggunakan software Image J.

### **3.5 Parameter Pengamatan**

1. Parameter Morfologis dan Fisiologis (parameter pertumbuhan) dilakukan untuk mengetahui perbandingan pertumbuhan antara varietas Mentik Wangi dengan Rojolele setelah diberi beberapa konsentrasi N yang meliputi :
  - a. Tinggi tanaman (cm), diukur mulai dari permukaan tanah hingga ujung daun tertinggi.
  - b. Jumlah anakan, dihitung berdasarkan jumlah anakan yang terbentuk pada setiap tanaman.
  - c. Berat segar tajuk (gram), Sampel batang dan daun padi aromatik yang telah ditimbang menggunakan timbangan analitik.

- d. Berat kering tajuk (gram), Sampel batang dan daun padi aromatik yang telah ditimbang berat segarnya dikeringkan di bawah sinar matahari, lalu ditimbang menggunakan timbangan analitik pada akhir penelitian.

## 2. Analisis Kandungan Klorofil Total

Kandungan klorofil total diukur dengan menggunakan metode Winterman dan De Mots (1965). Ekstraksi kandungan klorofil daun dilakukan dengan membekukan sampel daun padi aromatik menggunakan nitrogen cair, kemudian sampel diambil sebanyak 0,1 gram dan digerus dengan mortar hingga menjadi tepung. Tepung sampel disuspensikan dengan 0,5 ml 10 mM  $H_3BO_3$ . Suspensi sebanyak 40  $\mu$ l ditambahkan ethanol sebanyak 960  $\mu$ l kemudian divortex hingga homogen, selanjutnya diinkubasi ke dalam kulkas ( $4^\circ C$  selama 30 menit). Suspensi disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 8000 rpm dan suhu  $10^\circ C$ . supernatant diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 649 nm dan 665 nm. Konsentrasi klorofil a dan b dihitung berdasarkan rumus berikut :

$$\text{Klorofil a} = (13,7 \times \text{Abs}_{665}) - (5,76 \times \text{Abs}_{649}) = \mu\text{g klorofil/g sampel}$$

$$\text{Klorofil b} = (25,8 \times \text{Abs}_{649}) - (7,60 \times \text{Abs}_{665}) = \mu\text{g klorofil/g sampel}$$

$$\text{Klorofil Total} = \text{Klorofil a} + \text{Klorofil b} = \mu\text{g klorofil/g sampel}$$

3. Analisis Profil Protein dengan metode 2 Dimensi Elektroforesis yang menghasilkan berat molekul protein berdasarkan nilai pI nya. Profil protein yang diamati meliputi berat molekul (BM), kehadiran pita protein, tebal tipis pita protein atau luas area spot protein yang terbentuk.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Perlakuan Nitrogen berpengaruh nyata terhadap parameter pertumbuhan tanaman (morfologi dan fisiologi) kedua varietas padi aromatik. Perlakuan Nitrogen terbaik (tertinggi) terdapat pada konsentrasi N sedang (3.2 mM) dan N tinggi (13.2 mM). Varietas Mentik Wangi memiliki nilai parameter pertumbuhan yang lebih tinggi dari pada Rojolele pada parameter berat basah, berat kering dan kandungan klorofil total.
2. Perlakuan Nitrogen berpengaruh nyata terhadap pola profil protein protein pada kedua varietas padi aromatik. Perlakuan Nitrogen terbaik pada Varietas Mentik Wangi terdapat pada konsentrasi N sedang (3.2 mM) dan pada Varietas Rojolele terdapat pada konsentrasi N tinggi (12.8 mM) yang ditunjukkan dengan ketebalan pita protein tertinggi.
3. Parameter pertumbuhan dan pola profil protein sangat berkaitan erat pada tiap konsentrasi N. Kedua varietas padi aromatik mengalami peningkatan pertumbuhan dan ketebalan profil protein seiring dengan peningkatan konsentrasi N

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, perlu dilakukannya pengujian lanjut yaitu western blot dan uji In gel digestion dengan metode MALDI TOF mass spectrometry untuk mengetahui jenis-jenis protein secara pasti yang terdapat pada spot-spot protein yang ditemukan.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Arnon, D. I. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. 2015. *Aroma Wangi Pandan pada Pertanaman Padi Aromatik* .<http://bbpadi.litbang.pertanian.go.id>. Diakses 26 September 2016.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. dan Parker, J. 1992. *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall. Englewood Cliffs: New Jersey
- Chai-hong, S., Guang-rong, L., Jing-yuan, W., Cai-fei, Y and Wen-xiong, L. 2008. Differential Proteomic Analysis of Leaf Development at Rice (*Oryza sativa*) Seedling Stage. *Agricultural Science in China*, 7 (9):1153-1160.
- Chaturdevi, I. 2005. Effect of Nitrogen Fertilizer on Growth, Yield and Quality of Hybrid Rice (*Oryza sativa* L.). *Eur Agric.* 6(4): 611-618.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2006. Rice International Commodity Profile. <http://www.fao.org/> Diakses 7 Oktober 2016.
- Fuentes, S.I., Allen. D.J., Lopez, A.O and Henandez, G. 2001. Over-expressin of cytosolic glutamin synthetase increases photosynthesis and growth at lw nitrogen concentration. *Experimental Botany*, 52 (358) : 1071- 1081.
- GE Healthcare. 2004. 2-D Electrophoresis Principles and Methods. Germany : Technical University of Munich.
- Glaszmann, J.C. 1987. 'Isozymes and classification of Asian rice varieties'. *Theor. Appl. Genet.* **74**: 21-30.
- Hinge, V.R., Patil, H.B and Nadaf, A.B. 2016. Aroma volatile analyses and 2AP characterization at various developmental stages in Basmati and Non-Basmati scented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Springer open*, 9 : 38 (2-22)
- Hirel, B., Tétu, T., Lea, P.J and Dubois, F. 2011. Improving Nitrogen Use Efficiency in Crops for Sustainable Agriculture. *Sustainability*,3: 1452-1485.
- Hoagland, D. R and D.I Arnon. 1950. *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*. California: The College of Agriculture of California.
- Hofman, G and Cleemput, O.V. 2004. *Soil and Plant Nitrogen*. Paris: International Fertilizer Industry Association.

- Jacqueline, A., Prudente, Sigua, G.C., Kongchum, M and Prudente, A.D. 2008. Improving Yield and Nutrient Uptake Potentials of Japonica and Indica Rice Varieties with Nitrogen Fertilization. *World Journal of Agricultural Sciences*,4 (4): 427-434.
- Jean and Francois. 2010. Agarose Gel Electrophoresis – Applications In Clinical Chemistry. *JMB*, 29: 9 –14.
- Klug, W. S. & M. R. Cummings. 1994. *Concepts Of Genetics*. 4th Ed.Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Komatsu, S and Tanaka, N. 2004.Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome. *Proteomics*, 4:938–949.
- Lakitan, B. 2004. Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan. Rajagrafindo Persada. Jakarta.
- Lu JJ, Chang TT. 1980. Rice in Temporal and Spatial Prospective. In *Rice Production and Utilization*. Bor s. Luh (ed). West Port: AVI Pb.
- Magdeldin, S. 2012. Gel Electrophoresis -Principles And Basics. Intech Publisher : Rijeka, Croatia.
- Malcevski, A and Marmioli, N. 2012. Plant Protein Analysis. Proteomic Applications in Biology. [www.interchopen.com](http://www.interchopen.com).
- Manurung SO, Ismunadji M. 1999.*Padi: Buku Padi 1*. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Mildaerizanti, Indradewa, D dan Yudono, P. 2012. Pengaruh Perbedaan Benih Asal Pertanian Organik Dan Konvensional Terhadap Sifat Fisiologis Dan Hasil Padi Organik Kultivar Lokal Dan Unggul. *Ilmu Pertanian*, 15 (2) : 47 – 60.
- Mohamed, G.S., Turan, T., Ekiz, H.A and Baran, Y. 2011.The importance of protein profiling in the diagnosis and treatment of hematologic malignancies.*Turk J Hematol*, 28: 1-14.
- Nayer, Mohammadkhani, dan Reza Heidari. 2007. “Effects of Drought Stress on Soluble Proteins in two Maize Varieties”. *Turk J Biol*. 32 (2008) 23-30.
- Napasintuwong, O. 2012.*Survey of Recent Innovations in Aromatic Rice*. Departmen of Agricultural and Resource Economic.Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Ohyama, T. 2010. *Nitrogen as Major Essential Element of Plant*. Nitrogen Assimilation in Plant. Faculty of Agriculture. Niigata University. Japan

- Padmadi, B. 2009. Identifikasi Sifat Aroma Tanaman Padi Menggunakan Marka Berbasis Gen Aromatik. *Skripsi*. Departemen Biokimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor
- Pahlevi, R.Z., Bambang, G dan Suminarti, N. E. Pengaruh Kombinasi Proporsi Pemupukan Nitrogen dan Kalium Pada Pertumbuhan, Hasil dan Kualitas Tanaman Ubi Jalar (*Ipomea Batatas* (L.) Lamb) Varietas Cilembu Pada Dataran Rendah. *Produksi Tanaman*. 4(1): 16-22.
- Patti, P.S., Kaya, E dan Silahooy, C. 2013. Analisis Status Nitrogen Tanah Dalam Kaitannya Dengan Serapan N Oleh Tanaman Padi Sawah Di Desa Waimital, Kecamatan Kairatu, Kabupaten Seram Bagian Barat. *Agrologia*, 2, (1): 51-58.
- Pawirosemadi, M. 1980. *Metode hara berimbang optimum dalam analisis daun untuk petunjuk saran-saran pemupukan tanaman tebu (Saccharum Officinarum L.) di Indonesia*. Thesis. Fakultas Pertanian. Universitas Gajah Mada.
- Peng-Da Ma., Lu, T.C., Zhou, X.F., Zhu, X.J and Wang, X.Z. 2004. Preparation of Polyclonal Antibodies of Rubisco Large and Small Subunits and Their Application in the Functional Analysis of the Genes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 36 (9): 644–648
- Sandy, N.J., Nurhidayati, T dan Purwani, K.I. 2017. Profil Protein Tanaman Kiambang (*Salvinia molesta*) Yang Dikulturkan Pada Media Modifikasi Air Lumpur Sidoarjo. Program Studi Biologi, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya
- Seno, H.S., Hasan, Z.E., Kusbiantoro, B dan Santoso, T.J. 2009. *Interogasi Sifat Aroma dari Padi Varietas Pandan Wangi ke Varietas Ciherang Melalui Backcross dengan Bantuan Marka Berbasis Gen*. Ringkasan Eksekutif Hasil- hasil Penelitian Tahun 2009. Institut Pertanian Bogor dan Badan Litbang Pertanian.
- Sikuku, P.A., Kimani, J.M., Kamau, J.W and Njinju, S. 2016. Influence of Nitrogen Supply on Photosynthesis, Chlorophyll Content and Yield of Improved Rice Varieties under Upland Conditions in Western Kenya. *American Journal of Experimental Agriculture*, 13(2): 1-14.
- Siregar, A dan Marzuki, I. 2011. Efisiensi Pemupukan Urea Terhadap Serapan N Dan Peningkatan Produksi Padi Sawah (*Oryza sativa*. L.). *The Efficiency of Urea Fertilization on N uptake and Yield of Lowland Rice (Oryza sativa, L.)*. *Budidaya Pertanian*, 7 (2) ; 107-112.

- Sitompul, S. M. dan B. Guritno, 1995. Analisis Pertumbuhan Tanaman. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Suzuki, Y and Makino, A. 2012. Availability of Rubisco Small Subunit Up-Regulates the Transcript Levels of Large Subunit for Stoichiometric Assembly of Its Holoenzyme in Rice1 Graduate School of Agricultural Science. *Plant Physiology*, 160 :533–540
- Tjitrosoepomo, G. 2004. *Taksonomi Tumbuhan (Spermathopyta)*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Warda. 2011. Keragaan Beberapa Varietas Unggul Padi di Kabupaten Bantaeng Sulawesi Selatan. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Selatan. Seminar Nasional Serealia. Sulawesi Selatan.
- Yamori, W and Caemmerer, S.V. 2009. Effect of Rubisco Activase Deficiency on the Temperature Response of CO<sub>2</sub> Assimilation Rate and Rubisco Activation State: Insights from Transgenic Tobacco with Reduced Amounts of Rubisco Activase1[W][OA]. *Plant Physiology*, 151: 2073–2082.
- Yang, Y., Dai, L., Xia, H., Zhu, K., Liu, H and Chen, K., 2013. Protein profile of rice (*Oryza sativa*) seeds. *Genetics and Molecular Biology*, 36 (1) : 87-92.

LAMPIRAN

Lampiran A. Hasil analisis ragam seluruh variabel percobaan

**Tinggi Tanaman**

SK	db	JK	KT	F-Hit	F-Tabel		Ket.
					5%	1%	
Perlakuan	7	3821,79	545,97	31,47	2,66	4,03	**
Varietas	1	3453,6	3453,6	199,1	4,49	8,53	**
Nitrogen	3	239,58	79,86	4,61	3,24	5,29	**
V x N	3	128,6	42,8667	2,47	3,24	5,29	ns
Galat	16	210,3067	13,14417				
Total	23	4039,376	175,625				

**Jumlah Anakan**

SK	db	JK	KT	F-Hit	F-Tabel		Ket.
					5%	1%	
Perlakuan	7	19,33333	2,761904	3,012986	2,66	4,03	*
Varietas	1	0,166667	0,166667	0,181819	4,49	8,53	ns
Nitrogen	3	10,33333	3,444443	3,757574	3,24	5,29	*
V x N	3	8,833333	2,944444	3,21212	3,24	5,29	ns
Galat	16	14,66667	0,916667				
Total	23	34	1,478261				

**Berat Kering Tajuk**

SK	db	JK	KT	F-Hit	F-Tabel		Ket.
					5%	1%	
Perlakuan	7	7,32125	1,045893	4,081799	2,66	4,03	**
A	1	2,996267	2,996267	11,69351	4,49	8,53	**
B	3	4,083417	1,361139	5,312107	3,24	5,29	**
AB	3	0,241567	0,080522	0,314254	3,24	5,29	ns
Galat	16	4,099733	0,256233				
Total	23	11,42098	0,496564				

**Kandungan Klorofil Total**

SK	db	JK	KT	F-Hit	F-Tabel		Ket.
					5%	1%	
<b>Perlakuan</b>	7	182,0198	26,00283	15,61077	2,66	4,03	**
<b>A</b>	1	33,40254	33,40254	20,05318	4,49	8,53	**
<b>B</b>	3	139,4645	46,48817	27,90913	3,24	5,29	**
<b>AB</b>	3	9,152735	3,050912	1,831612	3,24	5,29	ns
<b>Galat</b>	16	26,65116	1,665698				
<b>Total</b>	23	208,671	9,072652				

Keterangan :

db = derajat bebas

JK = Jumlah Kuadrat

KT = Kuadrat Tengah

F Hit = F Hitung

Lampiran B. Dokumentasi Penelitian



Tanaman padi aromatik dalam kultur hidroponik



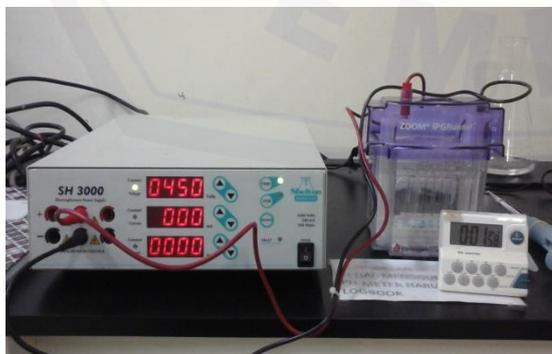
Pengukuran pH pada larutan nutrisi media hidroponik



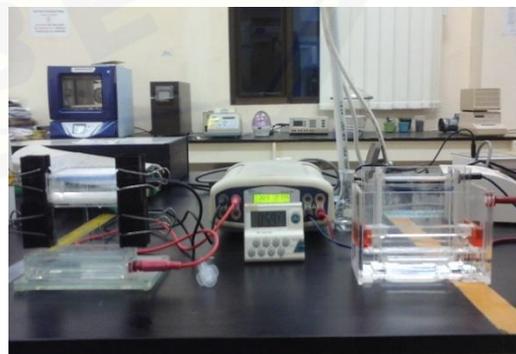
Bahan kimia untuk pembuatan larutan nutrisi Hoagland



Pembuatan gel SDS PAGE



Proses running sampel protein pada dimensi pertama (*Iso electofocusing*)



Proses running sampel protein pada dimensi kedua (SDS PAGE)

