

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING LANJUTAN



PERUBAHAN BIOSINTESIS SUKROSA SEBELUM PERTUMBUHAN KUNCUP KETIAK PADA PANILI (*Vanilla planifolia*)

Ketua Peneliti:

Dr. I GEDE KETUT ADIPUTRA

Anggota:

IR. AA. KM. SUARDANA, MSI

DRS. I MADE SUMARYA, MSC

DRS ISRAIL SITEPU, MSI

PUTU SUDIARTAWAN, SSI, MSI

FAKULTAS MIPA, UNIVERSITAS HINDU INDONESIA,
DENPASAR

November 2008

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Nomor: 266/SP2H/PP/DP2M/III/2008, Tanggal 6Maret 2008.



PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS HINDU INDONESIA DENPASAR
(PUSAT DOKUMENTASI DAN INFORMASI PENGETAHUAN HINDU)
JALAN SANGALANGIT, TEMBAU, PENATIH, TELP. (0361)462920
DENPASAR

SURAT KETERANGAN

Nomor:20/Perpus/UNHI/VIII/2010

Yang bertanda tangan di bawah ini Kepala Perpustakaan Universitas Hindu Indonesia dengan ini menerangkan bahwa:

Nama : Dr. I Gede Ketut Adiputra
NIP : 131 652 189
Tempat/Tanggal Lahir: Tabanan/7 September 1957
Pangkat/Golongan : Penata Muda Tk. I/ III B
Jabatan : Lektor
Unit kerja : Dosen DPK pada jurusan Biologi, Fakultas MIPA,
Universitas Hindu Indonesia Denpasar.

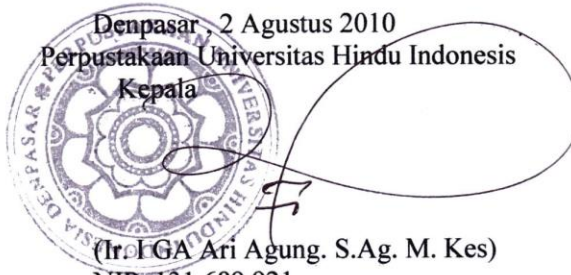
Memang benar telah menyerahkan kepada perpustakaan Universitas Hindu Indonesia sebuah karya ilmiah yang berjudul:

Perubahan biosintesis sukrosa sebelum pertumbuhan kuncup ketiak pada panili (*Vanilla planifolia*). Laporan penelitian Hibah bersaing, FMIPA, UNHI, Denpasar.

Untuk disimpan dan dipublikasikan di Perpustakaan Universitas Hindu Indonesia dengan nomor registrasi:

DKI No.: 386

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Denpasar, 2 Agustus 2010
Perpustakaan Universitas Hindu Indonesia
Kepala

(Ir. IGA Ari Agung, S.Ag. M. Kes)
NIP: 131 689 921

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN

1. Judul Penelitian : Perubahan biosintesis sukrosa sebelum pertumbuhan kuncup ketiak pada setek panili (*Vanilla planifolia*)

2. Ketua Peneliti:

- a. Nama lengkap : Dr. I Gede Ketut Adiputra
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- k. NIP : 131 652 189
- d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
- e. Jabatan Struktural : Ketua Lab MIPA, UNHI.
- f. Bidang keahlian : Nutrient transport pada tumbuhan
- g. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi.
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Hindu Indonesia, Denpasar.
- i. Tim Peneliti

No	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1	I Gede Ketut Adiputra Doktor	Nutrient transport	MIPA/ BIOLOGI	UNHI
2	AA. Km. Suardana, Ir. MSi	Biotek Pertanian	MIPA/ BIOLOGI	UNHI
3	I Made Sumarya, Drs, MSi	Biokimia	MIPA/ BIOLOGI	UNHI
4	Israil sitepu, Drs, MSi	Statistik	MIPA/ BIOLOGI	UNHI
5	Putu Sudiartawan, SSI, MSi	Ekologi	MIPA/ BIOLOGI	UNHI

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 80 juta
- c. Biaya yang disetujui tahun 2007 : Rp. 35 juta
- d. Biaya yang disetujui tahun 2008 : Rp. 45 Juta

Mengetahui
Dekan Fakultas MIPA

Drs Gde Rimaya, DMM
NIP: 140 158 414

Denpasar, 15 November 2008
Ketua Peneliti

Dr. I Gede Ketut Adiputra
NIP: 131 652 189

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian

Ir. A.A. Km. Suardana, MSi
NIP:131 791 532

RINGKASAN

Penelitian Tahun I

Sukrosa merupakan bentuk karbohidrat utama yang ditranslokasikan oleh tumbuhan, dari penghasil (sugar source) ke bagian lain tumbuhan yang memerlukan (sugar sink). Sukrosa ini disintesa di dalam sitosol, dari glukosa-6-fosfat dan fruktosa, yang melibatkan enzim sukrosa sintase.

Glukosa-6-fosfat tersebut merupakan hasil interkonversi gliseraldehid-3-fosfat sebagai produk reduksi karbon pada siklus Calvin-Benson. Rangkaian reaksi dalam siklus tersebut sering disebut dengan reaksi gelap karena tidak memerlukan sinar matahari. Walau demikian reaksi ini memerlukan hasil reaksi terang berupa ATP dan NADPH. Oleh karena itu, produksi sukrosa ini merupakan jalur reaksi dalam fotosintesis yang melibatkan beberapa faktor a.l. khlorofil, sinar, air, CO₂, fosfat, dll. Dengan meningkatkan faktor-faktor tersebut, produksi hasil fotosintesis dapat diharapkan akan meningkat. Misalnya, unsur hara fosfat mempengaruhi hampir 30% dari hasil panen. Akan tetapi, konsentrasi hasil fotosintesis yang disalurkan melalui floem ada kalanya tidak proporsional dengan laju fotosintesis terutama karena cepatnya mengalami biosintesis menjadi amilum atau diuraikan untuk memperoleh energi sehingga pengaruh unsur hara fosfat tersebut terhadap konsentrasi sukrosa pada floem masih memerlukan kajian yang lebih rinci.

Hubungan antara ketersediaan unsur hara fosfat dan konsentrasi sukrosa pada floem ini sangat penting untuk diketahui karena dapat digunakan sebagai indikator terhadap pemenuhan kebutuhan tumbuhan akan unsur hara tersebut. Pentingnya indikator ini terutama disebabkan oleh suatu tuntutan agar pemakaian pupuk kimia dibatasi agar tidak merusak lingkungan disamping harga pupuk, yang semakin mahal, dapat meningkatkan biaya produksi.

Untuk mengetahui hubungan antara ketersediaan unsur hara fosfat dan konsentrasi sukrosa pada floem maka dilakukanlah penelitian menggunakan panili sebagai subjek penelitian, dengan menguji konsentrasi sukrosa pada ekstrak internode stek panili, yang terdiri dari 2 nodus, yang dipanen dari pohon induk setelah dipupuk dengan TSP

sebanyak 500 g/pohon. Konsentrasi sukrosa tersebut kemudian dibandingkan dengan konsentrasi sukrosa pada kontrol.

Dua experiment, yang dilakukan di lapangan, menunjukkan bahwa pertumbuhan kuncup ketiak pada stek yang sebelumnya diberi TSP justru lebih rendah dari control. Pengujian terhadap kadar sukrosa pada tanaman ini kemudian dilakukan setelah ekstraksi menggunakan aquadest dan konsentrasi diatur sebesar 0.1 g FW/ml ekstrak. Pada pengujian ini, sukrosa tidak dapat dideteksi, baik secara kualitatif menggunakan Uji Benedict maupun secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer atau HPLC. Akan tetapi setelah metode ekstraksi diperbaiki yaitu menggunakan etanol 70%, inkubasi 24-36 jam dan evaporasi selama 1 jam serta konsentrasi diatur lebih tinggi yaitu 1 g FW/ml, maka sukrosa pada tumbuhan dapat dideteksi baik secara kualitatif dengan uji Benedict maupun kuantitatif dengan spektrofotometer. Pengujian ini menunjukkan bahwa kadar sukrosa pada tanaman kontrol lebih tinggi dari kadar sukrosa pada tanaman yang diberi TSP. Dari data ini kemudian disimpulkan bahwa rendahnya pertumbuhan pada stek tanaman yang diberi TSP diakibatkan oleh rendahnya penyediaan sukrosa dari daun ke internode. Diduga penyebabnya adalah bahwa pada pemberian TSP dengan dosis yang tinggi (500 g/pohon), fosfat anorganik terakumulasi sangat tinggi didalam tumbuhan dan menyebabkan turunnya pH pada ruang stroma kloroplast. Rendahnya pH ini mengakibatkan lemahnya system pemanenan energi matahari untuk menghasilkan energi metabolik ATP. Keadaan ini selanjutnya mengakibatkan rendahnya kemampuan tumbuhan untuk mereduksi CO₂ dan mentranslokasikannya ke internode. Rendahnya sukrosa yang tersedia di internode selanjutnya mengakibatkan rendahnya daya tumbuh.

Penelitian tahun II

Pengembangan metode diagnostik sukrosa yaitu mengobservasi produk fotosintesis, setelah pemberian pupuk sesuai gejala defisiensi yang ditunjukkan tanaman, merupakan upaya untuk mengetahui tambahan unsur hara yang diperlukan tumbuhan. Upaya ini diharapkan dapat mengevaluasi apakah pupuk yang diberikan sesuai atau tidak sesuai dengan jenis atau jumlah yang diperlukan. Penelitian yang dimaksudkan untuk mengembangkan metode diagnostik ini menggunakan informasi yang telah didapat pada

penelitian sebelumnya (Penelitian tahun I), yang menunjukkan bahwa laju biosintesis sukrosa pada tanaman panili (*Vanilla planifolia*) terhambat oleh pemberian pupuk fosfat dosis tinggi (500 g/pohon). Hambatan biosintesis ini berpengaruh terhadap pertumbuhan kuncup ketiak pada stek. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa biosintesis sukrosa berkorelasi positif dengan pertumbuhan.

Untuk mengetahui jenis pupuk yang diperlukan agar laju biosintesis menjadi optimal, uji diagnostik sukrosa terhadap beberapa jenis pupuk lainnya kemudian dilakukan pada penelitian tahun II. Penelitian tahap kedua ini dimaksudkan terutama untuk mengetahui apakah tumbuhan *Vanilla planifolia* yang dibudidayakan pada suatu lahan di daerah penyangga hutan masih memerlukan tambahan unsur hara NPK. Untuk tujuan ini maka sebanyak 24 pohon panili yang dipilih secara random dibagi dalam dua experiment yaitu experiment 1 dan experiment 2. Pada experiment 1, dosis pupuk yang diberikan setiap pohon adalah dosis standard yaitu Urea 9.25 g, TSP 1.1 g dan KCl 4.6 g. Pupuk ini diberikan setelah dilarutkan dalam air dan dituangkan disekitar pangkal pohon yang digunakan sebagai stump. Pada daerah ini banyak terdapat akar panili yang merupakan akar penyerapan unsur hara dari dalam tanah. Tumbuhan yang diberikan pupuk tersebut berjumlah 4 pohon untuk masing-masing perlakuan yaitu kelompok tumbuhan yang diberi Urea, TSP dan KCl. Sebuah kelompok tumbuhan yang tidak diberi pupuk, yang juga dibudidayakan pada lahan yang sama digunakan sebagai kontrol. Pengambilan sampel terhadap subjek penelitian ini dilakukan sebanyak 3 x yaitu pengambilan sampel pada hari yang sama dengan hari pemberian pupuk (T0), pengambilan sampel 10 hari setelah pemberian pupuk (T1) dan pengambilan sampel 20 hari setelah pemberian pupuk (T2). Bagian tumbuhan yang digunakan sebagai sampel adalah pucuk tanaman panili yang berisi sekitar 7 daun dari apeks. Sampel ini kemudian dibagi menjadi daun dan batang, diekstrak dan diukur kadar sukrosanya menggunakan kadar glukosa terhidrolisa. Pengujian kualitatif terhadap sampel ini dilakukan menggunakan uji Benedict dan kadar gula ditetapkan berdasarkan warna endapan yang terbentuk yang dibandingkan dengan warna endapan pada konsentrasi gula authentic standard. Pada ekperiment 1 ini ditemukan bahwa sukrosa sebagai hasil fotosintesis disimpan sebagian besar dalam internode (Tabel 01).

Tabel 0.1. Hidrolisa dan uji kualitatif sample tanaman panili (Expt. 1) yang dipanen pada H0, H10 dan H20 setelah pemberian pupuk. Setelah uji Benedict, konsentrasi sukrosa diestimasi dengan membandingkan warna endapan pada sampel dan larutan standard. Est.Suc.Conc; Estimated sucrose concentration

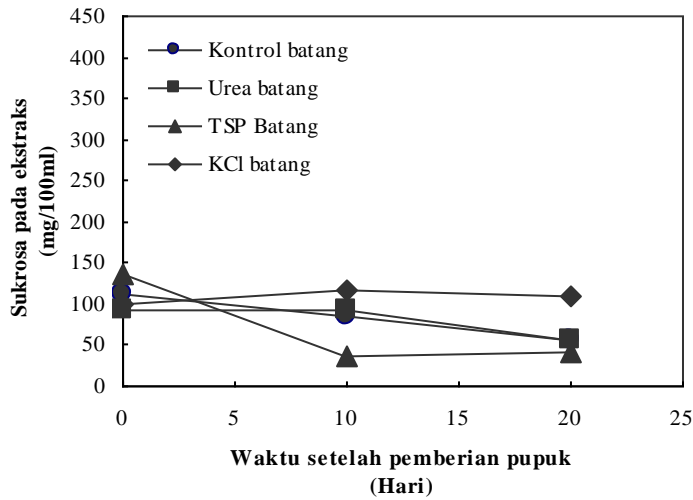
Eksp. 1	Est.suc.conc (%)								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0	0.00	<<0.5	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5
T1	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	0.00	0.00	<<0.5
T2	0.00	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	≈0.5	0.5<

Pengujian kadar sukrosa secara kuantitatif menguatkan hasil yang didapat dari uji kualitatif tersebut yaitu bahwa sebagian besar sukrosa ditemukan pada internode. Hampir pada semua tanaman yang diuji, kadar sukrosa pada daun lebih rendah dari pada kadar sukrosa pada internode. Hal ini dapat dilihat secara kuantitatif pada tabel 02.

Tabel 02. Uji kuantitatif kadar sukrosa pada ekstrak panili eksperimen 1 menggunakan metode Nelson-Somogyi.

Eksp. 1	Kadar sukrosa kuantitatif (mg/100 ml)							
	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
	Kontrol		Urea		TSP		KCl	
	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
T0	98.421	110.847	75.531	92.535	79.782	136.353	50.025	98.748
T1	92.214	86.001	53.301	93.195	43.818	36.951	35.97	117.72
T2	49.05	56.571	55.263	56.898	40.221	41.202	50.031	108.564

Namun demikian, pemberian pupuk dengan dosis standard pada eksperimen 1 ini belum dapat meningkatkan kadar sukrosa pada tanaman. Data ini ditemukan baik pada uji kualitatif maupun kuantitatif. Untuk lebih jelasnya, perubahan kadar sukrosa pada eksperimen 1 ini diperlihatkan dalam bentuk grafik perubahan sukrosa internode (Gambar 01).



Gambar 01. Perubahan kadar sukrosa internode eksperimen 1 setelah diberikan pupuk pada dosis standard.

Oleh karena itu, estimasi diagnostik terhadap jenis pupuk yang masih perlu diberikan, tidak dapat ditetapkan melalui experiment 1 ini. Untuk itu, experiment kedua kemudian dilakukan dengan cara menaikkan dosis pupuk yang diberikan pada setiap pohon.

Experiment 2 yang merupakan perbaikan metode uji dari experiment 1 dilakukan menggunakan prosedur yang sama, kecuali bahwa dosis pupuk yang diberikan adalah lebih banyak yaitu Urea 18.5 g/pohon, TSP 2.2 g dan KCl 9.2 g/pohon. Data yang diperoleh pada experimen 2 ini menunjukkan adanya kenaikan kadar sukrosa yang cukup tinggi 11 sampai 24 hari setelah pemberian pupuk terutama pada pemberian pupuk TSP dan KCl (Tabel 03).

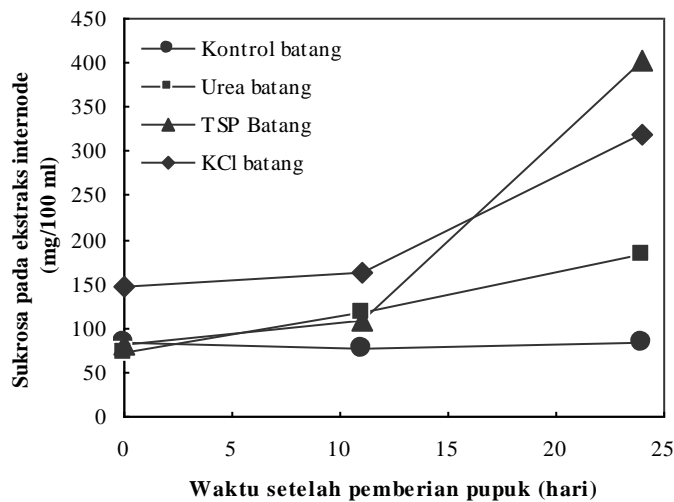
Tabel 03. Hasil uji kualitatif kadar sukrosa pada sample tanaman panili yang dipanen pada Expt. 2. Kadar sukrosa (Est. Suc. Conc.) diestimasi menggunakan larutan sukrosa authentic standard: <<0.5, sangat rendah dibanding konsentrasi larutan standard 0.5%; <0.5, lebih rendah dari 0.5%; ≈0.5, hampir sama dengan 0.5%

Eksp. 2	Estimated Sucrose. Concentration (%).								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	
T0	0.00	<0.5	<0.5	0.00	≈0.5	0.00	<<0.5	0.00	<0.5
T1	0.00	0.00	<0.5	<0.5	≈0.5	0.00	<0.5	<0.5	<0.5
T2	0.00	0.00	<0.5	0.00	<<0.5	<<0.5	≈0.5	0.00	≈0.5

Pada uji kualitatif, kadar sukrosa pada kontrol relatif tidak berubah dari T0 sampai T2. Kadar sukrosa pada kontrol ini berbeda dengan tanaman yang diberi pupuk, misalnya

tanaman yang diberi pupuk urea mengalami kenaikan kadar sukrosa setelah 11 hari (T1), tetapi kadar ini nampaknya menurun pada T2. Penurunan kadar sukrosa kualitatif ini (estimated sucrose concentration) kemungkinan dipengaruhi oleh kenaikan kadar sukrosa yang tinggi pada tumbuhan yang diberi TSP atau KCl pada T2. Pada dua tanaman ini yaitu yang diberi TSP dan KCl terjadi kenaikan kadar sukrosa yang konstan dan kadarnya sangat tinggi pada T2.

Uji kuantitatif kadar sukrosa dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi, menguatkan adanya kenaikan kadar sukrosa setelah pemberian pupuk yang lebih tinggi yaitu Urea 18.5 g/pohon, TSP, 2.2 g/pohon dan KCl 9.6 g/pohon. Seperti nampak pada gambar 02, kadar sukrosa T2 pada ekstrak internode tanaman yang diberi TSP dan KCl sangat mendekati perkiraan konsentrasi data kualitatif yaitu sekitar 0.5%.



Gambar 02. Perubahan kadar sukrosa yang ditemukan pada ekstrak tanaman panili setelah diberi pupuk dengan dosis 2 x dosis standard (Exp.2).

Pada uji kuantitatif ini, kadar sukrosa yang ditemukan , 24 hari setelah pemberian pupuk TSP dan KCl adalah 402.8 dan 318.5 mg/100 ml. Dengan demikian maka baik data kualitatif maupun data kuantitatif mengindikasikan bahwa tanaman panili yang dibudidayakan masih memerlukan tambahan unsur hara NPK.

Pada kondisi penelitian yang dilakukan dan apabila data yang ditemukan tersebut benar, uji diagnostik sukrosa yang dilakukan ini dapat merupakan metode yang cukup

effisien untuk mengetahui status nutrisi tumbuhan. Melalui uji diagnostik ini, pemberian tambahan unsur hara yang berupa pupuk dapat lebih sesuai dengan keperluan tumbuhan. Hal ini berarti pemberian pupuk yang bersifat spekulatif dapat dikurangi dan sekaligus mengurangi potensi kerugian baik ekologis maupun ekonomis.

Namun demikian, data yang ditemukan pada eksp. 2 ini memberikan beberapa pertanyaan yang memerlukan pengkajian lebih jauh baik terhadap metode diagnostik sukrosa maupun terhadap mekanisme penyediaan unsur hara tanaman. Pertanyaan tersebut adalah: (1) apa sebab tanaman panili yang dibudidayakan dengan legumes dapat mengalami kekurangan nitrogen, (2) apa sebab tanaman yang diberi TSP dan KCl memberi respon setelah lebih dari 20 hari.

Pertanyaan pertama dilatar belakangi oleh suatu fakta bahwa tanaman panili tersebut memiliki potensi sumber nitrogen yang tinggi karena dibudidayakan menggunakan leguminosae sebagai stump. Pada kondisi ini nitrogen dapat diperoleh secara alami baik melalui mineralisasi biomas dari stump atau hasil fiksasi nitrogen oleh bakteri. Berbeda dengan unsur hara nitrogen, unsur hara fosfat termasuk sumber yang tidak dapat diperbaharui secara alami. Oleh karena itu, tanaman panili lebih besar kemungkinannya mengalami defisiensi unsur hara fosfat dan potassium dari pada nitrogen.

Pertanyaan kedua dilatar belakangi oleh suatu teori bahwa unsur hara fosfat yang diserap tanaman sudah dapat terlibat dalam biosintesis dalam waktu kurang dari 10 menit (Mengel and Kirkby 1982, p. 398). Spekulasi yang dapat diajukan untuk menjelaskan kedua pertanyaan tersebut adalah terjadinya mekanisme hambatan penyerapan unsur hara pada tanaman panili, baik nitrogen dari legum maupun fosfor dari pupuk. Permasalahan ini tentu memerlukan kajian lebih banyak seperti yang diungkapkan oleh Foth 1995 bahwa karena beberapa alasan, penelitian tentang unsur hara tanaman tidak pernah berhenti.

SUMMARY

Preliminary study (First year)

Sucrose is the main form of photosynthate carbohydrate translocated by plants from sugar source into developing plant parts as sugar sinks. The sucrose is synthesized in the cytosol, from glucosa-6-fosfat and fructose in a process involving sucrose synthase. The glucosa-6-fosfat is the product of glyceraldehyd-3-fosfat interconversions which previously produced in a photosynthetic carbon reduction cycle, Calvin-Benson. The pathways of reaction in the cycles is known as dark reaction since it is not requiring light. Even though, the reaction requires the product of light reaction, i.e. ATP and NADPH. Therefore, sucrose production is a pathway of photosynthetic reaction that involving factors such as, chlorophyll, light, water, CO₂, phosphate, etc. In theory, increasing the amount of the factors would increase photosynthetic production. For examples, phosphate fertilizer could affect about 30% of crops. However, the content of these photosynthates in a phloem might not proportional with the rate of photosynthetic activities because sucrose could be synthesized very fast into inert molecules, starch. The sucrose could also be degraded to generate energy for other biosynthesis. So, the increase of photosynthetic activities, after the application of phosphorus fertilizer, and sucrose content in the phloem still need further study, particularly in developing diagnostic methods for phosphorus sufficiency in plants.

The correlation of phosphorus uptake and sucrose content in the plants is very critical in developing an indicator for the diagnostic methods. This method is developed in order to reduce the use of chemical fertilization in order to save environment beside the fact that fertilizer is continuously become more expensive and increase the production cost.

This study is performed to understand more about the correlation between sucrose content and the amount of phosphorus fertilizer applied. Vanilla plants in this study, was fertilized with phosphorus as TSP before Vanilla cutting vines then harvested. Sucrose content in the phloem were then analyzed by extracting samples of internodes collected from 2 nodes Vanilla cutting vines, directly. Internodes extract were then examined for its sucrose content. This sucrose content in Vanilla cutting vines, previously fertilized

with phosphorus fertilizer, was then compared with sucrose content in Vanilla cutting vines of control plants.

This study showed that the growth of lateral bud in the cutting of fertilized plants was slower than in control plants. Observation of sucrose content in the plants, after extraction of this plant parts using water and its concentration was adjusted into 0.1 g FW/ml, the sucrose was not detected whether qualitatively using Benedict test, or quantitatively using spectrophotometer and HPLC. However, after the methods of extraction was improved by using ethanol (70%), 24-36 h incubation, 1 h evaporation and the concentration was adjusted into 1 g/ml, the sucrose was detected whether qualitatively using Benedict test or quantitatively using spectrophotometer. Sucrose content was found higher in control plants rather than in TSP added plants. It is concluded that the slow growth of lateral bud in the TSP added plants attributed by the low amount of sucrose available in the internodes. This report proposed that application of high amount of TSP fertilizer into the Vanilla plants resulted in the inhibition of sucrose biosynthesis and weakened the light energy harvesting system which produced metabolic energy ATP. The mechanism of inhibition was started from the high accumulation of inorganic phosphate in the plants which then decreased pH in the stroma chloroplast and slowed CO₂ reduction and the production of ATP. This slow production of ATP then decreased the ability of plants to export sucrose into internodes via phloem loading, since this process require relatively a high amount of energy. The low sucrose content in the internodes eventually decreased the ability of lateral bud, in the Vanilla cutting vines, to grow.

Advance study (Second years)

The development of sucrose diagnostic methods i.e. monitoring the photosynthetic product sucrose after the application of fertilizer, according to the deficiency symptom shown by plants, is an effort to identify the most important element required by plants to grow. This effort is aimed to assess whether fertilizer applied into growth medium could meet the element require by plants qualitative and quantitatively. Development of this diagnostic methods is based on information that has been found during the preliminary

study in the first year which showed that the rate of sucrose biosynthesis in *Vanilla planifolia* is inhibited by the application of high phosphorus amount (500 g TSP per plant). This inhibition then affected the growth of lateral bud in *Vanilla* cutting vines. The studies concluded that sucrose biosynthesis and growth is positively correlated.

In order to observe the most important fertilizer require by plants to enhance the biosynthetic rate, sucrose diagnostic test for various other fertilizer application is conducted during the second year of study. This study is aimed particularly to reveal whether *Vanilla planifolia* grown in a plantation near forest area (kawasan penyangga hutan) still need fertilizer addition such as N, P, K to enhance growth. In a further application, this study is also developed to become an instrument for a diagnostic test of nutrient status in plants. For this purposes, more than 24 *Vanilla* plants were randomly selected and then divide into 2 set of experiments; Expt. 1 and Expt. 2.

In this first experiment, the amount of fertilizer applied into each plant is a standard dose, Urea 9.25 g, TSP 1.1 g and KCl 4.6 g. This dosage was calculated based on HK Deinum analysis on the amount of N, P, K nutrient decreased because of harvest. According to the analysis, N, P and K taken from plantation because of the production of 300 kg dried vanilla bean /hectare is equal to the amount of 33.3 kg Urea, 4 kg TSP and 16.6 kg KCl. Assuming that vanilla plants grown per ha were 3600 plants, the amount of nutrient loss per plants is about equal to the standard dosage. This fertilizer was applied into the base of main stem of stump plants after previously diluted in a tap water. In the area, vanilla roots were particularly found which is used by the vanilla plants to take up nutrient from the soil mediums. For each experiment, 3 batches of plants were supplied with Urea, TSP and KCl and the other batches was not added fertilizer as control plants. Each batch of the plants were then harvested 3 time; T0, harvest that was made just after the application of fertilizer; T1, harvest that was made 10 days after the application of fertilizer and T2 is a harvest that was made 20 days after the application of fertilizer. *Vanilla* cutting vines harvested from the vanilla plants was about 7 nodes from the apex which then dissected into leaf and stem. These plants parts were then weighed and incubated for 24 h in alcohol 70% before ground in a mortar. These homogenates were then filtered using cotton and the filtrate was then placed on a hot plate to evaporate the alcohol. After the evaporation the volume were then adjusted to make a 1 g/ml solution.

5 ml of this solution was then pipetted into test tube and hydrolyzed by addition of 5 drops of HCl before placed in boiled water for 30 minutes. The hydrolyzed solution was then taken 5 drops and put into a test tube, added 15 drops of Benedict solution before placed in a boiled water for 5 minutes. The color of this solution was then compared with a standard authentic sucrose solution for it estimated concentration.

This first experiment found that sucrose synthesized in the leaves is largely stored in the internodes. As shown in tab 04, sucrose concentration in the internodes extract was found higher in most Vanilla extract examined. Internodes in the Vanilla plants are most likely play as a storage organ for sucrose synthesized in the leaf.

Tabel 04 Qualitative analysis for sucrose content in Vanilla extract (Expt. 1) harvested at day 0, 10 and 20 after the application of fertilizer. The sucrose content was estimated by comparing the color changes in standard solution and extract solution after Benedict reagent were added into the solution. Est.Suc.Conc; Estimated sucrose concentration (%)

Eksp. 1	Est.suc.conc (%)								
	Water	Vanilla extract (1 g FW/ml)							
		Control		Urea		TSP		KCl	
		Leaf	internode	Leaf	internode	Leaf	internode	Leaf	internode
T0	0.00	<<0.5	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5
T1	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	0.00	0.00	<<0.5
T2	0.00	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	≈0.5	0.5<

Quantitative analysis that subsequently conducted for this extract also found that internodes contain a higher concentration of sucrose rather than leaf extract. Almost in all Vanilla extract examined, sucrose concentration in the internodes was higher than leaf extract (table 05).

Table 05. Quantitative analysis, for sucrose concentration in Vanilla extract of experiment 1, Conducted using Nelson-Somogyi method.

Eksp. 1	Kadar sukrosa kuantitatif (mg/100 ml)							
	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
	Kontrol		Urea		TSP		KCl	
	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
T0	98.421	110.847	75.531	92.535	79.782	136.353	50.025	98.748
T1	92.214	86.001	53.301	93.195	43.818	36.951	35.97	117.72
T2	49.05	56.571	55.263	56.898	40.221	41.202	50.031	108.564

Although this quantitative analysis (Tab. 02) confirming the qualitative analysis (Table 01), both data showing that addition of fertilizer using a standard doses did not enhance sucrose concentration in the plants. Therefore, identification of nutrient supplement that still require by Vanilla plants unable to be estimated by this first experiment, using

sucrose diagnostic test. Other experiments were then performed by increasing the amount of fertilizer supplied per Vanilla plants.

Experiment 2 was improved methods for examining the kind of nutrient supplement require by Vanilla plants. This second experiment using similar procedure, except that the amount of fertilizer supplied was higher i.e. Urea, 18.5 g; TSP, 2.2; and KCl 9.2 g/plant. Qualitative analysis on the vanilla extract in this experiment found that sucrose concentration was increased 11 and 24 day after the fertilizer was supplied, particularly in plants supplied with TSP and KCl (Table 06).

Tabel 06. Hasil uji kualitatif kadar sukrosa pada sample tanaman panili yang dipanen pada Expt. 2. Kadar sukrosa (Est. Suc. Conc.) diestimasi menggunakan larutan sukrosa autentik standard: <<0.5, sangat rendah dibanding konsentrasi larutan standard 0.5%; <0.5, lebih rendah dari 0.5%; ≈0.5, hampir sama dengan 0.5%

Eksp. 2	Estimated Sucrose. Concentration (%).								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
T0	0.00	<0.5	<0.5	0.00	≈0.5	0.00	<<0.5	0.00	<0.5
T1	0.00	0.00	<0.5	<0.5	≈0.5	0.00	<0.5	<0.5	<0.5
T2	0.00	0.00	<0.5	0.00	<<0.5	<<0.5	≈0.5	0.00	≈0.5

In the qualitative analysis, sucrose concentration in the extract of control plants was almost unchanged from the time of fertilizer application until day 24. However, in fertilizer added plants, the concentration was found higher than control almost in all extract observed. Urea added plants have been found to show a higher sucrose concentration just a few hours after the application (T0). This amount was increased at harvest 2 (T1). However, qualitatively, the concentration was then decreased at harvest 3 (T2). The lower sucrose concentration found in harvest 3 was possibly attributed by the qualitative techniques which estimating concentration using a macroscopic color identification. E.g. Since the color of urea added plants was much lower then the color of TSP and KCl added plants, estimation made for sucrose concentration in harvest 3 is then become lower.

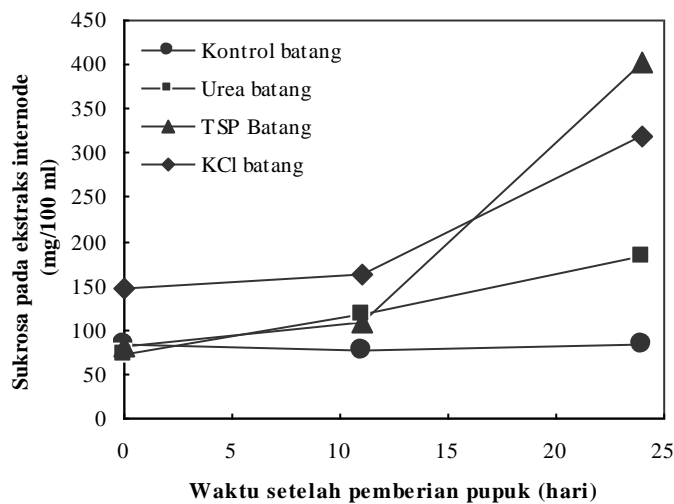
In order to improve the qualitative analysis, quantitative observation was then performed by measuring hydrolyzed sucrose spectrophotometrically using Nelson-Somogyi methods. Quantitative analysis on the Vanilla extract, using this method, found that except control plants, addition of NPK fertilizer in this second experiment increased

sucrose concentration in the internodes of Vanilla plants in all nutrient added plants (Tab. 07).

Tabel 07. Sucrose content in Vanilla extract after addition of fertilizer in double doses (Expt.2)

Eksp. 2	Vanilla extract (1 g FW/ml)							
	Control		Urea		TSP		KCl	
	Leaf	internode	Leaf	internode	Leaf	internode	Leaf	internode
T0	62.784	83.712	52.974	71.286	91.56	81.75	69.65	146.169
T1	115.10 4	76.845	70.959	117.07	55.263	107.91	31.07	163.827
T2	53.628	83.385	100.06	182.47	62.784	402.864	113.1	318.498

As shown in Tab. 04, internodes of control plants was never found to contain sucrose higher than that found in T0, but in fertilized plants the sucrose content was increased into 112, 132 and 162% (relative T0) in T1 of KCl, TSP and Urea added plants. A surge increased was then found in harvest 3 (T2) accounted for about 217, 492.8 and 256% (relative T0) in KCl, TSP and Urea added plants. The increased of sucrose concentration is also provided in fig.03. Since sucrose biosynthesis in fertilizer added plants were found increase whether in qualitative or quantitative analysis, the evidence is therefore strongly indicated that Vanilla plants grown in the plantation are undergoing nutrient insufficiency.



Gambar 03. Sucrose content in Vanilla extract after addition of fertilizer in Expt. 2

Under condition of experiment and if the data found is correct, sucrose diagnostic test can be regarded as a relatively efficient methods for diagnosing nutrient status in plants. This method does not require a complement result from crop production analysis since

sucrose content in the internodes could represent the production. Therefore, these diagnostic tests enable identification of nutrient status in an earlier deficiency condition. By using this method, the kind of nutrient supplement applied into plantation could also become more suitable to the nutrient required because a suspected element required by plants could be tested easily. Implying that speculative fertilizer application that potential to make economical or ecological losses can be minimized.

Studies on sucrose diagnostic test described in this report raise some question that requires further examination. For example, addition of nitrogen fertilizer in Vanilla plants grown in mixed culture with legumes increased sucrose concentration for up to 2.5-fold. It is not clear whether nitrogen fixed by legumes symbiotic bacteria unable to increase nutrient that available for the growth of Vanilla. The other problem is concerning the respond of plants after the addition of phosphate fertilizer. In theory, phosphate taken up by plants has been involved in a metabolic process in less than 10 minutes (Mengel and Kirby 1982, p.318). In this study, sucrose content was found increase for almost 5-fold at day 24. It is not clear whether phosphate applied as TSP require more than 20 days until it available for sucrose biosynthesis. Those questions certainly waiting further studies in order to improve crops production in an enhanced sustainable farming. As D. Foth (1995, p. 596) stated that for some reasons studies on fertilizer management is never completed.

PRAKATA

Atas asung wara kerta nugraha Ida Sang Hyang Widhi Wasa (Tuhan Yang Maha Esa), laporan penelitian dengan judul “Perubahan biosíntesis sukrosa sebelum pertumbuhan kuncup ketiak pada panili (*Vanilla planifolia*)” dapat diselesaikan sesuai dengan waktu yang telah direncanakan. Penelitian ini adalah usaha perbaikan penyediaan pangan tanpa merusak lingkungan hidup, yaitu melalui pengembangan metode evaluasi ketersediaan unsur hara bagi tanaman dengan uji diagnostik sukrosa. Melalui pengujian ini diharapkan pemakaian pupuk tidak menyebabkan kerusakan lingkungan atau sebaliknya perbaikan lingkungan tidak perlu harus mengakibatkan terjadinya ancaman terhadap penyediaan pangan.

Sebagaimana telah diuraikan pada laporan sebelumnya bahwa perbaikan produksi pertanian dan perkebunan untuk meningkatkan pendapatan memerlukan pemakaian pupuk. Akan tetapi, pemakaian pupuk kimia a.l. fosfat dan urea secara tidak tepat sering dipermasalahkan karena dianggap potensial sebagai penyebab terjadinya kerusakan lingkungan terutama karena terjadinya akumulasi unsur hara fosfor di perairan. Situasi ini selanjutnya mengisyaratkan agar dilakukan peningkatan efisiensi pemakaian pupuk sintesis. Sebaliknya, dengan adanya tuntutan terhadap produksi yang tinggi, pemberian tambahan unsur hara berupa pemupukan sering dilakukan secara tidak efisien.

Atas pertimbangan ekonomi dan lingkungan tersebut, maka dianggap perlu untuk mengembangkan suatu teknik diagnosa yang dapat mengidentifikasi apakah suatu jenis tumbuhan yang dibudidayakan telah mendapat unsur hara sesuai yang diperlukan. Pada laporan penelitian tahun I, teknik ekstraksi dan pengukuran kadar sukrosa pada tanaman panili telah ditemukan. Penemuan ini selanjutnya dapat mengetahui hubungan antara pertumbuhan kuncup ketiak dan biosintesis sukrosa pada tanaman yang menunjukkan korelasi positif. Hubungan ini diperlihatkan oleh data pemberian pupuk TSP dosis tinggi yang menghambat biosintesis sukrosa dan selanjutnya menghambat pertumbuhan kuncup ketiak pada stek panili. Sebaliknya, tanaman kontrol yang tidak diberi TSP memiliki kandungan sukrosa yang lebih tinggi dan setelah transplantasi menunjukkan pertumbuhan yang lebih cepat. Dengan penemuan tersebut, uji diagnostik sukrosa terhadap unsur hara lain seperti Urea dan KCl dapat dilakukan dengan desain penelitian yang lebih kompleks

a.l. melakukan observasi perubahan kadar sukrosa dengan melakukan sampling sebanyak 3 x pada tiap perlakuan.

Metode uji ini cukup sederhana sebagai alat evaluasi ditinjau dari segi teori atau metode uji yang diperlukan. Misalnya, untuk mengetahui apakah tambahan unsur hara berupa pupuk sesuai dengan yang diperlukan tanaman maka hanya memerlukan uji kadar sukrosa pada tanaman sampel setelah diberi pupuk tersebut. Uji ini menggunakan asumsi bahwa pemberian pupuk sesuai keperluan tanaman akan menaikkan biosintesis sukrosa. Oleh karena itu, apabila kadar sukrosa naik setelah pemberian pupuk berarti pupuk tersebut sesuai dengan unsur hara yang diperlukan. Apabila kadar sukrosa naik maka tambahan unsur hara tersebut masih diperlukan. Uji kadar sukrosa juga relatif sederhana, biasa digunakan dalam praktikum mahasiswa S1, bahkan mahasiswa diploma. Dengan kesederhanaan itu diharapkan lebih mungkin diterapkan dalam agricultural practice di negara berkembang seperti Indonesia sehingga perbaikan produksi bahan pangan tidak menjadi ancaman serius terhadap kelestarian lingkungan hidup atau sebaliknya pemeliharaan kelestarian lingkungan hidup tidak sampai mengancam penyediaan bahan pangan.

Setelah dilakukan uji diagnostik sukrosa terhadap tambahan unsur hara NPK pada tanaman panili, yang dibudidayakan pada suatu lahan didaerah penyangga hutan, ditemukan data yang cukup menarik. Tanaman panili yang dibudidayakan menggunakan pohon pelindung (stump) dari famili leguminosae memiliki potensi sumber nitrogen yang cukup tinggi. Potensi nitrogen yang tinggi ini mengakibatkan munculnya spekulasi bahwa tanaman tersebut tidak mungkin kekurangan unsur hara nitrogen. Akan tetapi, setelah dilakukan uji diagnostik pada kondisi penelitian yang dilakukan, penambahan urea sebanyak 18.5 g/pohon justru meningkatkan kadar sukrosa pada tanaman sampai melebihi 250% (relatif kontrol). Jumlah ini melebihi kenaikan yang terjadi akibat penambahan KCl. Pada uji diagnostik ini, pemberian TSP hanya sebanyak 2.2 g/pohon ditemukan menaikkan kadar sukrosa sampai lebih dari 400% (relatif kontrol). Dengan uji diagnostik ini, spekulasi pemberian pupuk dapat dikurangi karena respon tumbuhan terhadap pemberian pupuk dapat dievaluasi lebih dini. Misalnya, apakah NPK 1:1:1 lebih baik dari NPK 9:1:4 dsbnya. Namun demikian, penelitian lanjutan masih sangat

diperlukan terutama uji diagnostik sukrosa terhadap pupuk majemuk termasuk unsur mikro karena kompleksnya daerah rhizosphere dalam proses penyediaan unsur hara.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Yth, Bapak Direktur Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah memberi kepercayaan dan biaya penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Yth: Bapak Rektor Univ. Hindu Indonesia dan Ketua LP3M Univ. Hindu Indonesia yang telah memberi kepercayaan dan banyak bantuan sehingga penelitian ini bisa terselenggara. Bapak Dekan MIPA, Ketua Jurusan Biologi, Tim Peneliti serta rekan-rekan Dosen dan Karyawan di lingkungan Univ. Hindu Indonesia yang telah banyak memberikan bantuan dan saran-saran, juga diberi ucapan terimakasih.

Ketua Tim Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN.....	iii
RINGKASAN.....	iv
SUMMARY.....	xi
PRAKATA.....	xviii
DAFTAR ISI.....	xxi
DAFTAR GAMBAR, FOTO DAN TABEL.....	xxiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. STUDI PUSTAKA	6
2.1 Penilaian status nutrisi pada tumbuhan.....	6
2.2 Tahap-tahap reaksi yang diperlukan oleh biosintesis sukrosa	7
2.3 Inkorporasi unsur hara dalam fotosintesis	10
2.4 Pentingnya diagnostik sukrosa sebelum pemberian pupuk	12
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	19
3.1 Tujuan Umum.....	19
3.2 Tujuan khusus penelitian	20
3.3 Urgensi penelitian.....	20
BAB IV. METODE PENELITIAN	22
4.1 Pendahuluan.....	22
4.2 Desain penelitian.....	23
4.3 Kondisi pertumbuhan pohon induk panili dan cara pemberian pupuk	23
4.4 Transplantasi stek panili	27
4.5 Ekstraksi sukrosa pada tanaman panili	28
4.6 Identifikasi dan kuantifikasi sukrosa pada sampel tumbuhan panili	29
4.6.1 Pembuatan larutan standard sebagai pembanding	30
4.6.2 Penentuan kadar sukrosa secara kualitatif	30

4.6.3 Penentuan kadar sukrosa secara kuantitatif pada ekstrak tanaman panili.....	32
4.7 Analisa data.....	36
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	40
5.1 Hasil Penelitian Experiment 1.	40
5.1.1 Pengambilan sampel dan ekstraksi sukrosa	40
5.1.2 Hidrolisa dan uji kualitatif kadar sukrosa pada larutan standard dan sampel..	43
5.2 Hasil penelitian experiment 2.	47
5.2.1 Pengambilan sampel dan ekstraksi sukrosa	47
5.2.2 Hidrolisa dan uji kualitatif kadar sukrosa experiment 2.	49
5.3 Pengukuran kadar sukrosa secara kuantitatif pada ekstrak tanaman panili	54
5.3.1. Studi pendahuluan.....	54
5.3.2 Pembuatan “glukosa terhidrolisa standard” (1)	56
5.3.3. Pembuatan ”glukosa terhidrolisa” standard 2.	58
5.3.4 Pembuatan larutan ”glukosa terhidrolisa standard 3”	60
5.3.5 Pembuatan larutan ”glukosa terhidrolisa standard 4”	62
5.3.6 Pengukuran kadar glukosa terhidrolisa pada sampel.	64
5.4 Pembahasan.....	72
5.4.1 Kondisi pertumbuhan panili di perkebunan.....	72
5.4.2 Teknik uji diagnostik sukrosa	75
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	80
6.1 Kesimpulan	80
6.2 Saran-saran.....	80
DAFTAR PUSTAKA	81
DRAF ARTIKEL ILMIAH	84
SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	103

DAFTAR GAMBAR, FOTO DAN TABEL

GAMBAR

01. Perubahan kadar sukrosa internode eksperimen 1 setelah diberikan pupuk pada dosis standard.....	viii
02. Perubahan kadar sukrosa yang ditemukan pada ekstrak tanaman panili	ix
03. Sucrose content in Vanilla extract after addition of fertilizer in Expt. 2	xvi
2.1. Skema mekanisme pemanenan energi didalam klorofil	8
2.2. Skema pemakaian hasil reaksi terang, ATP dan NADPH, untuk reduksi CO ₂	9
2.3. Perubahan biosintesis sukrosa yang dapat terjadi karena adanya perubahan kesetimbangan kimia baik pada lahan maupun pada tanaman	17
4.1. Perubahan biosintesis sukrosa yang dapat terjadi setelah pemberian pupuk	22
4.2. Pembuatan larutan stok (stock solution) dan pengencerannya sesuai dosis yang diperlukan yaitu TSP 0.027 mM, Urea 8 mM, KCl 0.3 mM	27
4.3. Metode ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili	29
4.4. Contoh kurve standard yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi	34
4.5 Model data diagnostik yng digunakan untuk mengetahui tambahan unsur hara yang diperlukan tanaman.....	39
5.1. Kurve standard uji pendahuluan	55
5.2. Kurve standard 1	58
5.3. Kurve standard 3	62
5.4. Kurve standard 4	64
5.5. Rata-rata kadar sukrosa internode T0,T1, T2 Expt 1	67
5.6. Rata-rata kadar sukrosa internode T0,T1, T2 Expt 2	69
5.7. Perubahan kadar sukrosa pada ekstraks internode eksperimen 1.....	71
5.8. Perubahan kadar sukrosa pada ekstraks internode eksperimen 2	72

FOTO

1. Batas kawasan penyangga hutan Gunung Batukaru	21
2. Kondisi pertumbuhan pohon induk panili yang terletak di kawasan penyangga hutan Gunung Batukaru	24
3. Metode "drip irrigation" untuk menyirami bibit panili pada musim kering	28
4. Contoh pemberian label pada pohon panili yang digunakan sebagai subjek penelitian	41

TABEL

01 Hidrolisa dan uji kualitatif sampel tanaman panili (Eksp. 1)	vii
02 Uji kuantitatif kadar sukrosa pada ekstrak panili eksp. 1 menggunakan metode Nelson-Somogyi	vii
03 Hasil uji kualitatif kadar sukrosa pada sampel tanaman panili yang dipanen pada eksp. 2	viii
04 Qualitative analysis for sucrose content in Vanilla extract (Expt. 1)	xiv
05 Quantitative analysis, for sucrose concentration in Vanilla extract of expt. 1.	xiv
06 Hasil uji kualitatif kadar sukrosa pada sample tanaman panili yang dipanen pada expt. 2	xv
07 Sucrose content in Vanilla extract after addition of fertilizer in double doses (Expt. 2)	xvi
4.1 Desain penelitian untuk mengetahui kadar sukrosa setelah pemberian pupuk N, P, K, secara diagnostik.....	23
4.2 Dosis pemberian pupuk N, P, K pada beberapa penelitian	25
4.3 Uji sukrosa pada larutan standard	31
4.4 Uji sukrosa secara tidak langsung melalui uji gula terhidrolisa dengan pereaksi Benedict	32
4.5 Langkah-langkah pengukuran sukrosa secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer	33
4.6 Tabel pencatatan data absorbansi dari larutan standarad setelah diukur dengan spectrofotometer	34

4.7 Tabulasi data untuk menghitung konsentrasi larutan contoh menggunakan persamaan least-square $X = aY + b$	35
4.8 Contoh tabel statistik untuk menghitung nilai a dan b dalam persamaan $X = aY + b$	36
4.9 Metode data entri untuk dapat dianalisa menggunakan SPSS	37
4.10 Tabel analisis of variant untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.....	38
4.11 LSD test produksi sukrosa	38
5.1 Pohon induk panili yang digunakan sebagai subjek penelitian Expt. 1.....	41
5.2 Ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili Expt.1, pemanenan pertama (T0)	42
5.3 Ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili Expt.1, pemanenan kedua (T1).....	42
5.4 Ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili Expt.1, pemanenan ketiga (T2)	42
5.5 Konsentrasi larutan sukrosa standard dan warna endapan yang terjadi setelah uji Bennedict	43
5.6 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak tanaman panili Expt. 1 yang dipanen pada T0	44
5.7 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak tanaman panili Expt. 1 yang dipanen pada T1.....	46
5.8 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak tanaman panili Expt. 1 yang dipanen pada T2.....	47
5.9 Pemberian pupuk pada experiment 2	49
5.10 Ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili Expt.2, pemanenan pertama (T0)	50
5.11 Ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili Expt.2, pemanenan kedua (T1)	50
5.12 Ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili Expt.2, pemanenan ketiga (T2)	51
5.13 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak tanaman panili Expt.2 yang dipanen pada T0.....	52
5.14 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak tanaman panili Expt.2 yang dipanen pada T1....	53
5.15 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak tanaman panili Expt.2 yang dipanen pada T2 ...	54
5.16 Langkah-langkah pengujian glukosa terhidrolisa pada studi pendahuluan	55
5.17 Data absorbansi dari larutan standard 1	57
5.18 Konsentrasi larutan glukosa terhidrolisa untuk standard 2	58
5.19 Konsentrasi glukosa terhidrolisa dan data absorbansi	61
5.20 Hasil pengukuran absorbansi menggunakan prosedur 5.3.4	63

5.21	Tabel statistik untuk menghitung a dan b pada persamaan $X = aY + b$	65
5.22	Konsentrasi glukosa terhidrolisa (sukrosa) pada ekstrak sampel yang diukur menggunakan metode Nelson-Somogyi pada eksperimen 1	66
5.23	Konsentrasi glukosa terhidrolisa (sukrosa) pada ekstrak sampel yang diukur menggunakan metode Nelson-Somogyi pada eksperimen 2	68
5.24	Tabel Anova "Tests between-subject effects"	70
5.25	Multiple comparisons dengan uji LSD	70
5.26	Hasil uji kualitatif terhadap kadar sukrosa pada tanaman panili yang diberi pupuk Urea, TSP dan KCl pada eksperimen 1 dan 2	76

BAB I. PENDAHULUAN

Pertanian berkelanjutan (sustainable farming) dapat mencakup pengertian pemeliharaan kontinyuitas hasil panen. Untuk memelihara kontinyuitas ini, kondisi biologis, kimia maupun fisik dari lahan pertanian, yang menentukan hasil panen, juga perlu dipelihara. Akan tetapi karena naiknya tingkat konsumsi dan banyaknya alih fungsi lahan, maka daya dukung lahan pertanian terhadap kontinyuitas hasil panen menjadi semakin menurun.

Untuk mengimbangi tingginya tingkat konsumsi maka produktivitas lahan terus-menerus dinaikkan dengan cara pemakaian pupuk sintetis yang memiliki sifat praktis, cepat dan cukup sederhana untuk meningkatkan hasil. Cara ini dapat mengatasi kekurangan bahan makanan penduduk dunia sehingga dikenal dengan revolusi hijau. Namun demikian, sifat praktis, cepat dan sederhana tersebut, disamping kegunaan juga sangat cepat dapat merusak kondisi biologis, kimia maupun fisik lahan sehingga dapat menimbulkan dampak berupa terkontaminasinya air tanah dan meningkatnya biaya produksi (Suprpta 2007). Kekhawatiran terhadap terjadinya kerusakan lingkungan karena kemajuan teknologi tersebut selanjutnya mengubah arah pengembangan berbagai teknologi menuju teknologi ramah lingkungan yang bertujuan agar perbaikan ekonomi tidak diikuti oleh kerusakan lingkungan hidup.

Pada kasus yang lain, tingginya laju alih fungsi lahan pertanian menjadi kawasan non pertanian juga adalah faktor yang menyebabkan terjadinya penurunan hasil panen. Kasus yang kedua ini dapat diatasi dengan cara ekstensifikasi atau pembukaan lahan pertanian baru. Akan tetapi lahan tersebut sering merupakan lahan marginal yang memiliki berbagai permasalahan fisiologis bagi tanaman. Kondisi lahan marginal biasanya sangat asam sehingga secara biologis, kimia maupun fisik memiliki daya dukung yang rendah bagi produksi tanaman terutama padi. Pada pH yang rendah ini ditemukan adanya unsur aluminium yang tinggi yang dapat menghambat pertumbuhan padi (Miftahudin et al. 2007).

Dua permasalahan yang dapat menurunkan hasil panen tersebut yaitu kerusakan lahan secara alami pada lahan marginal dan kerusakan lahan karena pengelolaan yang tidak

tepat memerlukan adanya pengembangan teknologi agar tetap terpenuhinya kebutuhan penduduk akan pangan. Oleh karena itu, berbagai usaha pengembangan teknologi diperlukan dan menurut D. Foth 1995, h. 712, pengembangan teknologi ini diarahkan untuk efisiensi fotosintesis, perbaikan fiksasi nitrogen, perbaikan genetik dan efisiensi pemakaian unsur hara. Upaya pengembangan teknologi untuk mengatasi kerusakan lahan telah banyak dilakukan antara lain dengan pembatasan penggunaan pupuk kimia yang dikenal dengan pertanian organik. Walaupun cara ini mungkin paling baik untuk mengatasi kerusakan lahan tetapi metode ini memiliki ciri yang kurang populer yaitu rumit, kurang praktis dan sangat lambat dalam perbaikan hasil panen. Disamping itu, lahan yang mengalami kerusakan secara alami seperti pada lahan yang marginal, mungkin terlalu sulit diatasi dengan pertanian organik karena rendahnya pH. Oleh karena itu, seperti dikemukakan oleh D. Foth (1995, h. 596), untuk menyusun petunjuk dasar mengenai pemupukan, penelitian tidak pernah berhenti karena adanya varietas baru yang dikembangkan, teknik uji yang berubah dan terutama karena harapan terhadap hasil yang terus meningkat. D. Foth (1995, h. 594) juga mengemukakan bahwa penilaian terhadap jenis dan jumlah pupuk perlu dilakukan karena pupuk yang salah dapat berbahaya.

Berdasarkan pengalaman dan pengamatan sepiantas penulis, teknologi pemupukan yang diterapkan dalam system pertanian di Indonesia masih bersifat tradisional karena pemberian pupuk pada tanaman tidak didasarkan pada evaluasi terhadap status nutrisi tanaman. Walau pengamatan sepiantas ini mungkin tidak benar, tetapi diagnosa terhadap status nutrisi tumbuhan sebelum pemberian pupuk tetap dianggap sangat penting. Akan tetapi, teknologi yang tersedia untuk tujuan tersebut dipandang masih terlalu sulit dan sangat mahal. Oleh karena itu, penilaian terhadap unsur hara sering dilakukan hanya untuk penelitian laboratorium, penerapannya di lapangan menemukan berbagai kesulitan. Contoh: Untuk mengetahui unsur hara yang diperlukan tumbuhan biasanya dilakukan dengan mengubah komposisi nutrient secara hidroponik sebelum mengobservasi pertumbuhan (Boedijn et al. 1973, h. 4, Adiputra and Anderson 1992). Cara ini sangat sulit diterapkan dilapangan karena laju perubahan unsur hara yang tersedia sulit diketahui.

Untuk mengetahui status unsur hara pada tanaman budidaya biasanya dilakukan observasi gejala defisiensi atau mengukur konsentrasi suatu unsur per berat kering tanaman. Metode ini dengan mudah dapat mengetahui unsur hara yang kurang yaitu dengan membandingkan konsentrasi unsur hara pada tanaman yang diuji relative terhadap konsentrasi optimum. Misalnya, konsentrasi internal unsur hara N, yang dianggap cukup untuk menunjang pertumbuhan optimal adalah 1.5 % (Lakitan 1993). Menurut Foth (1995, h. 593-599), pengukuran ini tidak dapat memberi informasi tentang jumlah pupuk yang harus diberikan pada tumbuhan pada suatu lahan. Hal ini dapat dimengerti karena rendahnya kadar unsur hara pada tumbuhan diakibatkan tidak hanya oleh rendahnya ketersediaan unsur hara pada lahan, tetapi dapat juga diakibatkan oleh gangguan mekanisme penyerapan sehingga tidak memungkinkan terjadinya perolehan hara yang tinggi oleh tumbuhan. Salah satu contoh adalah gangguan penyerapan unsur hara karena tingginya kadar aluminium pada lahan yang sangat asam.

Pengujian lain yang juga sering dilakukan adalah uji ketersediaan unsur hara pada medium pertumbuhan. Uji ini dapat mengetahui jumlah dan jenis unsur hara pada sampel tanah, tetapi jumlah yang tersedia bagi tumbuhan pada suatu lahan juga sulit diketahui. Pada metode ini, permasalahan terletak pada tanah yang digunakan sebagai sampel yang diobservasi. Sampel tersebut sangat mungkin berbeda dengan daerah perakaran dimana tumbuhan dapat memperoleh unsur hara sehingga hasil observasi tidak menunjukkan unsur hara yang digunakan oleh tumbuhan. Beberapa kesulitan yang dihadapi untuk mengetahui ketersediaan unsur hara ini menyebabkan terjadinya pemberian pupuk secara spekulatif yang sangat potensial mengakibatkan kerusakan baik lingkungan ekosistem maupun produksi tumbuhan.

Salah satu alternatif yang mungkin dapat memberi sumbangan untuk mencegah kerusakan lingkungan tanpa mengganggu usaha pemenuhan kebutuhan akan bahan makanan adalah dengan mengembangkan metode diagnostik sukrosa. Metode ini terutama digunakan untuk mengidentifikasi apakah suatu tumbuhan telah memperoleh unsur hara yang cukup atau masih memerlukan pengayaan berupa pupuk. Indikator yang digunakan untuk diagnosa ini adalah hasil fotosintesis sukrosa, karena merupakan senyawa stabil yang ditranslokasikan oleh tumbuhan. Dari segi nutrisi, apabila tumbuhan memperoleh unsur hara yang cukup maka produksi sukrosa akan optimal. Sebaliknya,

apabila tumbuhan mengalami kekurangan unsur hara, maka produksi sukrosa akan berkurang. Identifikasi terhadap hasil fotosintesis sukrosa ini akan segera dapat mengetahui gangguan metabolisme pada tumbuhan sehingga perbaikan pertumbuhan dapat dilakukan lebih awal, sebelum terjadinya gangguan pertumbuhan karena defisiensi atau karena toksisitas.

Contoh dari kasus tersebut adalah penelitian yang dilakukan sebelumnya (Adiputra et al. 2007) yang menemukan bahwa pemberian unsur hara fosfat yang terlalu tinggi dapat menghambat biosintesis sukrosa dan kemampuan tanaman tersebut untuk tumbuh menjadi menurun. Penelitian tersebut kemudian menyebutkan bahwa hambatan biosintesis terjadi karena enzim rubisco tidak memiliki lingkungan yang optimal untuk memediasi biosintesis karena terjadi perubahan pH. Hal ini sesuai dengan pendapat Lakitan (1993, h.67) bahwa pada konsentrasi yang terlalu tinggi, unsur hara esensial dapat menyebabkan keracunan bagi tanaman. Pada contoh ini dapat dilihat bahwa hambatan pertumbuhan dapat terjadi tidak hanya karena kekurangan unsur hara (defisiensi) tetapi juga karena kelebihan (toksisitas).

Dengan pengukuran sukrosa yang dilakukan setelah pemberian pupuk fosfat pada populasi terbatas tersebut, maka kerusakan yang lebih luas karena kesalahan pemberian pupuk dapat dihindari. Hal ini dimungkinkan karena telah tersedianya data bahwa pemberian unsur hara esensial pada suatu lahan tidak selalu meningkatkan biosintesis terutama apabila kesetimbangan kimia yang terjadi mengubah lingkungan seluler menjadi tidak efektif bagi enzim untuk memediasi biosintesis. Dosis pupuk yang diberikan (500 g/pohon) pada lokasi penelitian jelas melewati batas maksimum yang seharusnya disediakan. Oleh karena itu, uji diagnostik ini memiliki implikasi yang cukup penting baik dari segi ekonomi maupun kelestarian lingkungan karena dosis tertinggi bagi unsur hara fosfat pada lahan tersebut telah diketahui atau minimal tidak boleh dilewati. Terjadinya akumulasi fosfat pada lahan melewati batas tersebut sudah hampir dapat dipastikan dapat merusak pertumbuhan maupun reproduksi. Namun demikian, perubahan kesetimbangan kimia dalam tumbuhan dipengaruhi oleh begitu banyak faktor yang apabila dijumlahkan mungkin tidak terhingga. Oleh karena itu pengetahuan tentang batas atas sebuah unsur pada suatu lahan sama sekali tidak dapat memastikan berapa jumlah unsur hara yang harus diberikan agar kesetimbangan kimia cukup optimal untuk

pertumbuhan dan reproduksi. Dengan memberi berbagai variasi pupuk dan mengamati pertumbuhan, masalah kesetimbangan kimia mungkin juga terlalu sulit untuk diatasi karena biosintesis tidak semata-mata tergantung pada unsur hara baik kuantitatif maupun kualitatif. Kesesuaian temperature misalnya sudah diketahui memegang peranan yang sangat penting untuk dapat terjadinya metabolisme yang optimum.

Berbagai kesulitan yang dihadapi untuk mendapatkan kondisi optimum bagi pertumbuhan dan reproduksi suatu spesies pada suatu jenis lahan memerlukan adanya suatu metode diagnostik yang dapat menggambarkan keadaan lingkungan yang mendukung terutama ketersediaan unsur hara dan jenis unsur hara yang masih diperlukan. Oleh karena sukrosa menentukan pertumbuhan dan merupakan hasil dari proses yang dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan, maka dengan ditemukannya metode pengukuran sukrosa pada jaringan tumbuhan yang relative sederhana, maka diagnosa terhadap pupuk tunggal maupun pupuk campuran sangat mungkin dapat dilakukan dengan lebih mudah. Pada laporan ini diuji metode diagnostik untuk mengetahui perubahan biosintesis sukrosa pada tumbuhan panili yang diberikan pupuk N, P, K pada lahan dikawasan penyangga hutan Gunung Batukaru.

BAB II. STUDI PUSTAKA

2.1 Penilaian status nutrisi pada tumbuhan

Menurut Mc Cray et al. (http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_SCO75), ada 2 jenis pendekatan yang digunakan untuk menilai status nutrisi pada tumbuhan yaitu pendekatan CNL (Critical Nutrient Level) dan DRIS (Diagnosis and Recommendation Integrated System). Penilaian status nutrisi dengan pendekatan CNL dilakukan melalui estimasi terhadap konsentrasi suatu nutrient yang berada pada tingkat yang membatasi produksi. Pendekatan ini terutama memperhatikan masalah konsentrasi suatu unsur dalam bagian tumbuhan tertentu pada suatu tingkat pertumbuhan yang dapat mengurangi produksi sampai 10%. Sementara itu pendekatan DRIS melakukan perhitungan terhadap indeks dengan membandingkan rasio nutrient yang terdapat pada suatu populasi dengan nutrient yang ditemukan pada populasi yang memiliki produksi tinggi. Metode DRIS ini memerlukan sejumlah data tentang konsentrasi nutrient pada jaringan tumbuhan yang menghasilkan panen rendah dan observasi jaringan tumbuhan yang menghasilkan panen tinggi.

Metode penilaian status nutrisi baik CNL maupun DRIS yang diuraikan tersebut memiliki akurasi yang sangat tinggi, akan tetapi untuk dapat diterapkan pada kondisi yang ada di Indonesia mungkin masih banyak menemukan kesulitan terutama karena memerlukan teknologi dan biaya yang cukup besar. Disamping itu, daerah tropis seperti Indonesia memiliki keanekaragaman populasi tumbuhan yang tinggi sehingga perubahan ketersediaan nutrisi dipengaruhi oleh begitu banyak faktor. Namun demikian, untuk tujuan pertanian berkelanjutan, penilaian tentang status nutrisi ini tentu merupakan bagian yang sangat penting karena seperti diungkapkan oleh Campbell dan Plank (2000) (<http://www.ncagr.com/agronomi/saaesd/sectl.htm>), kekurangan unsur hara (defisiensi) dan kelebihan unsur hara (toksisitas) dapat memiliki akibat yang hampir sama dalam membatasi hasil produksi. Oleh karena itu, apabila pemupukan dilakukan hanya berdasarkan pada produksi yang rendah, maka pemupukan ini sangat mungkin dilakukan

walaupun tumbuhan telah mengalami toksisitas karena kelebihan unsur hara. Pada kasus seperti ini, biaya produksi akan naik tanpa ada perbaikan produksi.

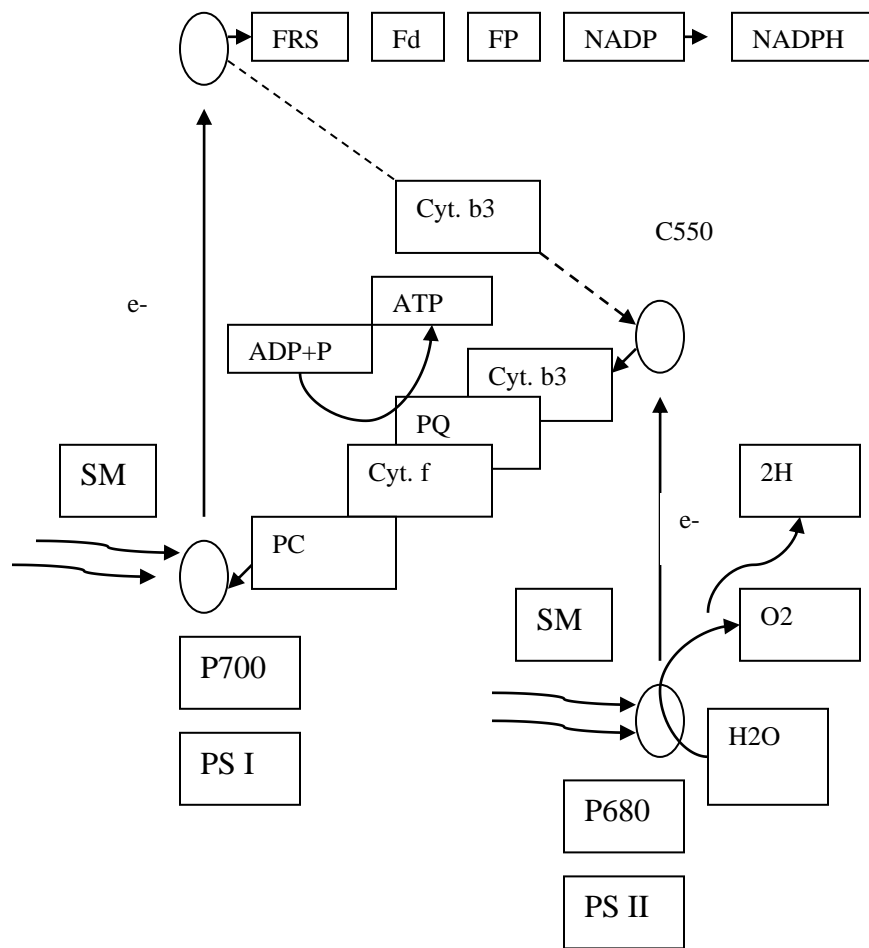
Untuk mengurangi potensi kerusakan akibat kurangnya informasi tentang status nutrisi maka diperlukan pengembangan metode diagnostik yang relative sederhana sehingga tidak memerlukan teknologi dan biaya yang terlalu tinggi. Untuk tujuan penilaian status nutrisi tumbuhan ini, metode yang dikembangkan adalah metode diagnostik sukrosa (Adiputra et al 2007) yaitu mengukur hasil fotosintesis sukrosa setelah pemberian sejumlah tertentu pupuk baik organik maupun anorganik pada populasi yang terbatas. Akurasi metode ini mungkin tidak terlalu tinggi, tetapi dapat mengurangi potensi kerugian akibat pemberian pupuk yang tidak tepat seperti pemupukan pada tanaman yang mengalami toksisitas. Pencegahan ini dapat dilakukan karena respon tumbuhan terhadap suatu pupuk dapat dilihat melalui observasi perubahan biosintesis sukrosa. Model kasus seperti ini telah diuji terhadap pupuk TSP pada tanaman panili (Adiputra et al. 2007). Pada penelitian tersebut, tanaman panili diberi pupuk dengan dosis tinggi (500 g/pohon) dan perubahan biosintesis sukrosa selanjutnya diukur, begitu juga pertumbuhannya. Penelitian tersebut menemukan bahwa penambahan pupuk akan mengubah kesetimbangan kimia pada tumbuhan dan selanjutnya mempengaruhi mekanisme penghasilan sukrosa. Oleh karena unsur essential yang berpengaruh pada penghasilan sukrosa cukup bervariasi, maka pengujian terhadap satu unsur hara saja tidak cukup memberi informasi tentang status nutrisi tanaman. Untuk lebih mengerti peranan unsur hara dalam biosintesis sukrosa, maka terlebih dahulu akan dibahas proses fotosintesis.

2.2 Tahap-tahap reaksi yang diperlukan oleh biosintesis sukrosa

Uji diagnostik sukrosa memerlukan pengetahuan dasar tentang mekanisme biosintesis terutama yang terjadi didalam kloroplast. Pada dasarnya mekanisme tersebut terdiri dari 2 tahap yaitu pemanenan energi sinar matahari dan pemakaiannya untuk reduksi CO₂.

Pemanenan energi sinar matahari

Proses penghasilan senyawa organik karbohidrat terjadi melalui 2 jenis reaksi yaitu reaksi terang dan reaksi gelap. Reaksi terang pada fotosintesis dilakukan didalam organel chloroplast, terutama pada membran dalam yang disebut dengan tilakoid. Pada membran ini terletak chlorofil, molekul pembawa elektron dan faktor-faktor yang diperlukan untuk terjadinya fosforilasi pada aliran elektron (Thorpe 1984, h. 436). Secara skematis, mekanisme pemanenan energi biasa digambarkan dengan skema Z sbb:

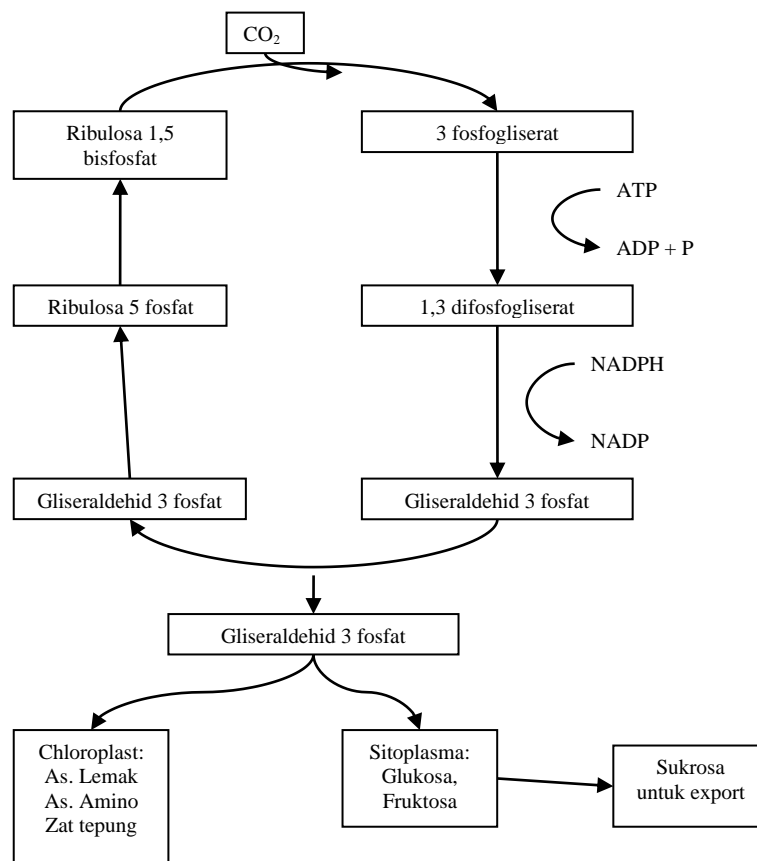


Gambar 2.1. Skema mekanisme pemanenan energi didalam klorofil.

Proses pemanenan energi matahari pada fotosintesis ini dilakukan melalui aliran elektron yang bersumber dari air dan berakhir pada koenzim NADPH. Diantara dua

ujung aliran ini terdapat dua titik dimana elektron pigment di “boosted” oleh sinar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Pada reaksi ini, air dioksidasi menghasilkan O₂ dan sebuah substrat direduksi.

Hasil pemanenan energi yang berupa ATP dan NADPH kemudian digunakan untuk mereduksi CO₂ menjadi senyawa organik yang dilakukan didalam ruang antar membran yang disebut stroma. Enzim-enzim yang diperlukan untuk reduksi CO₂ ini terdapat didalam ruang tersebut. Didalam stroma ini juga sering ditemukan adanya zat tepung (starch).



Gambar 2.2. Skema pemakaian hasil reaksi terang, ATP dan NADPH, untuk reduksi CO₂.

Reduksi CO₂

Hasil reaksi terang yang berupa ATP dan NADPH mempunyai berbagai fungsi didalam sel. Akan tetapi pemakaiannya yang paling penting adalah untuk mereduksi CO₂

menjadi karbohidrat. Tergantung pada kondisi fisiologis dari tumbuhan, hexosa dapat digunakan untuk biosintesis zat tepung yang disimpan dalam chloroplast sebagai granul. Secara skematis, mekanisme pemakaian NADPH untuk mereduksi CO_2 disajikan pada gambar 2.2.

2.3 Inkorporasi unsur hara dalam fotosintesis

Untuk mengembangkan metode diagnostik sukrosa, maka beberapa unsur esensial yang diperlukan tumbuhan sangat perlu diketahui terutama yang berhubungan dengan biosintesis sukrosa. Unsur-unsur yang berperan baik langsung maupun tidak langsung dengan biosintesis sukrosa a.l. adalah N, C, P dan K.

Unsur hara nitrogen

Nitrogen biasanya diambil oleh tumbuhan dari lingkungannya melalui akar dalam bentuk ion nitrat (NO_3^-) atau ion ammonium (NH_4^+). Senyawa nitrogen anorganik yang diambil oleh tumbuhan ini selanjutnya mengalami reduksi didalam tumbuhan menjadi suatu senyawa organik yaitu asam amino glutamin. Reduksi nitrogen anorganik ini sebagian besar terjadi di dalam akar dan tergantung dari ketersediaannya pada lahan, senyawa anorganik nitrogen juga dapat direduksi didalam daun (Gojon et al. 1991).

Didalam organisme hidup, biomolekul unit pembangun seperti asam amino dapat memiliki fungsi ganda yaitu membentuk makromolekul yang hanya tersusun dari unit yang sama atau dapat membentuk makromolekul dengan unit yang lain. Misalnya asam amino tidak hanya merupakan unit penyusun protein, tetapi dapat juga merupakan unit penyusun makromolekul lain seperti hormone, alkaloid dll (Lehninger 1988, h. 65). Didalam tumbuhan, asam amino glutamin dapat juga disintesa menjadi suatu senyawa yang berperan sangat penting dalam penyerapan energi sinar matahari yaitu chlorofil (Lakitan 1993). Menurut Albert et al. (1983, h. 517), molekul chlorofil ini mengandung 4 gugus yang mengandung nitrogen.

Dengan adanya kemampuan untuk menyusun berbagai makromolekul esensial dalam tumbuhan, maka nitrogen dianggap sebagai salah satu unsur yang paling banyak

diperlukan relative terhadap unsur lain yang diserap melalui akar. Jumlah unsur hara nitrogen di dalam tumbuhan dianggap cukup apabila konsentrasinya sekitar 1.5% dan konsentrasi ini adalah tertinggi diantara unsur hara lain yang diserap melalui akar. Dalam hubungannya dengan fotosintesis, hasil biosintesis unsur hara nitrogen ini sebagian besar berperan sebagai molekul struktural atau fungsional. Tetapi pada proses lanjut dari fotosintesis, yaitu setelah terbentuknya gliseraldehid-3-fosfat, inkorporasi senyawa nitrogen baru terjadi yaitu dalam penyusunan asam amino didalam chloroplast. Jadi fungsi utama dari biosintesis nitrogen sebagian besar adalah sarana bagi berlangsungnya biosintesis sukrosa. Gejala defisiensi unsur hara ini biasanya terlihat pada daun dewasa berupa warna yang menjadi hijau terang, menguning atau bahkan dapat menjadi mengering.

Unsur hara karbon

Unsur hara ini hampir seluruhnya diambil melalui udara berupa CO_2 dan dalam hubungannya dengan fotosintesis, senyawa karbon anorganik ini adalah salah satu dari dua substrat utama bagi reaksi biosintesis sukrosa. Produk pertama yang stabil dari fotosintesis yaitu gliseraldehid-3-fosfat adalah senyawa antara bagi terbentuknya senyawa-senyawa lain seperti asam lemak, asam amino, zat tepung dan yang paling penting bagi pertumbuhan jaringan meristematik yaitu sukrosa. Unsur hara karbon yang diambil dalam bentuk CO_2 ini terdapat dalam jumlah yang melimpah dan bahkan dikhawatirkan sebagai penyebab terjadinya pemanasan global. Oleh karena itu, kemungkinan tumbuhan mengalami defisiensi terhadap unsur hara ini adalah sangat kecil.

Unsur hara fosfor

Unsur hara ini tidak mengalami reduksi dalam tumbuhan dan sebagian besar didistribusikan dalam bentuk senyawa fosfat anorganik. Ikatan senyawa fosfat ini dengan molekul organik terjadi dalam bentuk ester dan dalam fotosintesis memiliki peran penting sebagai pemasok energi bagi biosintesis senyawa gliseraldehid-3-fosfat. Makromolekul

yang paling penting dalam proses tersebut adalah ATP dan NADPH, berfungsi untuk mengalirkan energi elektron dari tilakoid menuju pembentukan gliseraldehid-3-fosfat dalam reaksi gelap cahaya. Gejala yang ditunjukkan tanaman karena kekurangan unsur hara fosfor adalah daun dewasa berwarna hijau gelap, sering membentuk warna merah atau ungu (Foth 1995, h. 554; Lakitan 1993, h. 70).

Unsur hara potassium

Berbeda dengan unsur N, C dan P, unsur hara K tidak membentuk molekul organik didalam tumbuhan. Unsur ini tetap berada sebagai senyawa anorganik sehingga tidak berfungsi struktural. Dalam hubungannya dengan fotosintesis, unsur hara potassium banyak berperan dalam proses transport terutama membantu terjadinya translokasi molekul-molekul besar melewati membran melalui mekanisme pompa Na-K. Unsur hara potassium ini juga diduga berperan penting dalam proses membuka dan menutupnya stomata yang berfungsi untuk mengatur keluar masuknya air kedalam tumbuhan. Pengaturan ini sangat penting karena lingkungan dapat saja mengalami perubahan yang sangat serius yang berdampak pada gangguan fisiologis maupun biokimia didalam daun.

Kekurangan unsur ini tidak banyak mengubah laju fotosintesis secara langsung, tetapi berpengaruh terhadap penyediaan bahan-bahan penyusun molekul struktural atau fungsional yang berhubungan langsung dengan proses biosintesis. Gejala yang sering terlihat apabila tumbuhan kekurangan unsur hara potassium adalah terjadinya klorosis dan sering dijumpai bercak-bercak jaringan mati pada ujung, tepi dan jaringan antara tulang daun (Lakitan 1993, h.71; Foth 1995, h. 563).

2.4 Pentingnya diagnostik sukrosa sebelum pemberian pupuk

Dengan melihat keterlibatan unsur-unsur hara dalam menghasilkan sukrosa maka pengukuran biosintesis sukrosa sangat mungkin dapat digunakan sebagai alat diagnosa terhadap pemenuhan unsur hara pada tumbuhan. Eratnya hubungan antara unsur hara dan produksi sukrosa ini juga telah dikemukakan oleh Gardner et al. (1991, h. 30) yang

mengatakan bahwa keterbatasan unsur hara akan menyebabkan terbatasnya sintesis peralatan fotosintesis seperti chlorofil.

Peran penting pengetahuan tentang status nutrisi tumbuhan untuk pemberian tambahan unsur hara telah lama diketahui. Misalnya Chapman 1964 yang dikutip oleh Mulyani (1993) menyatakan bahwa diagnosis bermanfaat untuk mengetahui gejala dini penyakit dan gejala dini kekurangan unsur hara. Metode yang diuraikan untuk tujuan diagnosis tersebut menurut Mulyani (1993) adalah analisis jaringan dan analisis tanah yaitu mengidentifikasi kadar unsur hara pada tanah atau tanaman untuk mengetahui unsur hara tambahan yang masih diperlukan tanaman. Akan tetapi, teknik diagnosis ini, seperti telah diuraikan pada pendahuluan, adalah kurang tepat karena lebih banyak mengungkapkan permasalahan dari pada memberikan informasi tentang pupuk (Foth 1995, h. 599). Oleh karena itu, penelitian yang dilaporkan ini adalah upaya menemukan metode diagnostik yang lebih sederhana dan mampu memberikan informasi yang lebih mengarah pada tambahan unsur hara yang diperlukan tanaman. Upaya ini dilakukan dengan pengukuran hasil fotosintesis sukrosa sebelum dan setelah pemberian pupuk.

Untuk keperluan pemupukan tanaman tebu di Florida, menurut McCray et al. (http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_SCO75) pengetesan tanah secara berkelanjutan yang dikombinasikan dengan analisis daun adalah sangat penting. Dua pengetesan ini sangat bermanfaat untuk mengetahui ketersediaan nutrient bagi tanaman secara berkelanjutan dari tanah dan status nutrisi tumbuhan pada kondisi persediaan nutrient tersebut. Dengan pengetesan tersebut, unsur hara tambahan yang masih diperlukan dengan mudah diketahui. Akan tetapi, menurut Mc Cray, prosedur pemberian pupuk ini memiliki keterbatasan yaitu karena tidak tersedianya pengujian unsur hara pada tanah ataupun kalau ada tidak dikalibrasi dengan ketersediaan nitrogen dan mikronutrient. Disamping itu, uji tanah hanya dilakukan sebelum adanya perkebunan dan tidak dilakukan setelah tanaman berkembang.

Khusus untuk tanaman panili, diagnosis sukrosa dianggap sangat penting terutama karena teknik pemupukan panili memang belum banyak diketahui dan pemupukan yang dilakukan kebanyakan mengadaptasi teknik pemupukan untuk anggrek (Rismunandar 1989, h. 35). Walaupun merupakan anggota dari famili yang sama, sistem perakaran pada panili berbeda dengan perakaran pada tanaman anggrek yaitu adanya akar yang

digunakan untuk menyerap unsur hara dari dalam tanah. Hal ini berarti bahwa mekanisme penyerapan unsur tidak sama pada kedua anggota famili tersebut. Oleh karena itu, teknik pemupukan pada anggrek ini perlu dimodifikasi untuk dapat digunakan pada tanaman panili. Menurut analisis H. K. Deinum yang dikutip oleh Rismunandar 1989, h. 31, apabila tanaman panili yang luasnya 1 hektar dan menghasilkan 300 kg buah kering maka jumlah unsur N, P, K yang diangkut adalah 6, 2 dan 8 kg yang setara dengan 1/3 kwintal ZA, 1/25 kwintal TSP dan 1/6 kwintal KCl. Dengan asumsi jumlah tanaman/Ha = 3600 pohon, maka setiap pohon memerlukan pengayaan unsur hara sebesar:

$$\text{ZA: } \frac{100\text{kg}}{3 \times 3600} = \frac{100000\text{g}}{10800} = 9.25\text{g}$$

$$\text{TSP: } \frac{100000}{25 \times 3600} = \frac{100000\text{g}}{90000} = 1.1\text{g}$$

$$\text{KCl: } \frac{100000\text{g}}{6 \times 3600} = \frac{100000\text{g}}{21600} = 4.6\text{g}$$

Dalam perkembangan teknik pemupukan, terutama untuk pertanian berkelanjutan, diperlukan pertimbangan pemeliharaan kelestarian lingkungan. Sementara itu, pemberian pupuk yang sama secara terus menerus pada suatu lahan sangat potensial menimbulkan akumulasi suatu unsur yang mengarah pada tersedianya unsur tersebut pada tingkat yang melebihi kemampuan lingkungan untuk mengatasinya. Dalam situasi ini maka dapat dikatakan telah terjadi suatu kerusakan lingkungan. Oleh karena itu, seperti juga telah diuraikan pada pendahuluan, pengembangan metode penilaian status nutrisi perlu dilakukan secara berkelanjutan. Penilaian ini terutama untuk mengestimasi permasalahan seperti, apakah penambahan sejumlah tertentu pupuk anorganik dapat memelihara laju produksi, atau apakah penambahan sejumlah tertentu pupuk organik setara dengan pengurangan sejumlah tertentu pupuk sintetis. Pertanyaan ini merupakan masalah yang cukup mendasar mengingat baik kelestarian lingkungan maupun perbaikan produksi

sangat diperlukan bagi pertanian berkelanjutan, terutama dalam penyediaan pangan yang sehat dan cukup bagi penduduk.

Berdasarkan pertimbangan bahwa pertumbuhan dan reproduksi merupakan hasil akhir dari suatu mekanisme yang bersifat irreversible, maka indikator pemakaian pupuk menggunakan produksi panen adalah kurang sesuai bagi usaha perbaikan pada tumbuhan yang menghasilkan panen tersebut. Disamping hasil panen merupakan hasil akhir dari satu siklus (untuk tanaman semusim), hasil panen dapat berkurang tidak hanya oleh kekurangan tetapi juga oleh kelebihan unsur hara. Dengan demikian, diperlukan indikator yang bukan merupakan hasil akhir, agar masih mungkin dapat dilakukan perbaikan pada tanaman yang diobservasi.

Permasalahan yang hampir sama juga dapat terjadi pada tanaman tahunan di perkebunan. Setelah dilakukan pengambilan panen, unsur hara yang tersedia menjadi berkurang karena telah digunakan untuk mensintesis makromolekul yang terdapat dalam panen. Akan tetapi inflow unsur hara melalui recycling bahan organik pada lahan tersebut selama periode pemanenan tidak diketahui, walaupun pengurangan unsur hara ini dapat diestimasi dari jumlah panen yang diambil. Pada situasi ini, indikator status unsur hara juga menjadi sangat penting apakah penambahan sejumlah pupuk setelah panen dengan suatu komposisi telah sesuai dengan yang diperlukan.

Pada penelitian yang dilaporkan ini, unsur hara yang diberikan adalah N, P, K pada suatu tumbuhan yang relative tidak banyak menimbulkan pemiskinan unsur hara karena produksi yang relative sedikit yaitu tanaman panili (*Vanilla planifolia*). Tanaman ini memproduksi buah dalam kondisi optimum tidak lebih dari 300 kg/ha/tahun. Jumlah ini jauh lebih rendah dari tanaman padi yang dapat memproduksi hasil panen sampai 4 ton/ha/tahun. Disamping produksi yang rendah, tumbuhan ini secara tidak langsung memiliki inflow unsur hara yang relative tinggi karena menggunakan stump dari leguminosae dan biomass dari stump ini hampir 100% direcycles. Oleh karena itu tumbuhan ini relative tidak mengurangi unsur hara yang tersedia. Namun demikian, karena beberapa unsur hara bersifat unrenewable dan tanaman panili ditumbuhkan secara multikultur dengan tanaman produksi lain seperti coklat dan kopi, maka pemiskinan unsur hara pada lahan tersebut dapat terjadi.

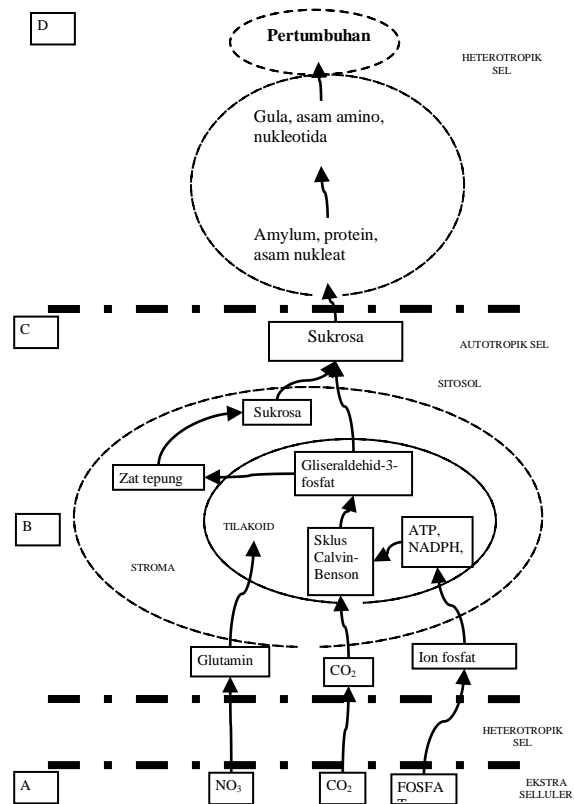
Pada penelitian sebelumnya (Adiputra 2005), pengaruh pemberian unsur hara NPK terhadap pertumbuhan kuncup ketiak pada stek panili telah dilakukan. Pada penelitian ini, pemberian unsur hara NPK sebanyak 400 g/pohon mempercepat pertumbuhan (relative kontrol). Akan tetapi pada akhir observasi, jumlah stek yang tumbuh adalah sama baik yang dipupuk maupun kontrol (Adiputra 2005, h. 98). Akan tetapi relative terhadap pemberian TSP 500 g/pohon (Adiputra et al. 2007), pertumbuhan kuncup setelah pemberian N, P, K 400 g/pohon ini jauh lebih baik, walaupun berapa jumlah optimal yang masih diperlukan belum diketahui terutama pada lahan yang digunakan sebagai lokasi penelitian.

Dengan memperhatikan fungsi dari berbagai unsur hara serta perbedaan jumlah yang diperlukan oleh tumbuhan, maka dengan jelas dapat dimengerti bahwa pemberian sebuah pupuk tunggal dalam jumlah yang banyak belum tentu dapat meningkatkan laju biosintesis sukrosa. Kebutuhan unsur hara yang telah lama dikenal sebagai hukum minimum Liebig, memerlukan suatu kajian yang komprehensif yang ternyata merupakan masalah yang sangat kompleks. Seperti telah diuraikan pada penelitian sebelumnya (Adiputra et al. 2007), pemberian unsur hara fosfat sebanyak 500 g/pohon justru menghambat biosintesis sukrosa yang selanjutnya mengakibatkan turunnya kemampuan pertumbuhan kuncup ketiak pada *Vanilla planifolia*. Permasalahannya adalah seberapa banyak unsur hara yang harus diberikan pada suatu tumbuhan pada suatu lahan sehingga sesuai dengan keperluannya untuk tumbuh secara optimal. Perhatian terhadap jumlah tersebut sangat penting disamping dimaksudkan untuk memenuhi kebutuhan tumbuhan akan unsur hara juga diperlukan untuk mencegah terjadinya kelebihan unsur hara yang dapat merusak lingkungan. Perhatian ini terutama diperlukan karena jumlah, baik kualitatif maupun kuantitatif, dapat berubah dengan laju yang sulit dimonitor. Salah satu upaya untuk mengatasi masalah ini telah dimulai pada penelitian tahun pertama yaitu dengan melakukan uji diagnostik tentang kebutuhan unsur hara fosfat pada suatu lahan perkebunan di daerah penyangga hutan Gunung Batukaru. Beberapa informasi penting yang telah ditemukan pada tahap pertama penelitian ini adalah:

1. Pengukuran terhadap indikator pertumbuhan yang berupa biosintesis sukrosa merupakan metode yang cukup sederhana. Oleh karena itu sangat mungkin

untuk dapat dilakukan pada tempat yang lebih luas baik dari segi unsur hara maupun dari segi jenis tumbuhan apabila uji diagnostik tersebut memang diperlukan.

- Indikator biosintesis sukrosa cukup jelas dapat mengindikasikan keperluan tumbuhan akan unsur hara, terutama fosfat, karena memiliki korelasi positif dengan laju pertumbuhan dan dapat berubah sesuai dengan perubahan unsur hara yang diberikan.



Gambar 2.3. Perubahan biosintesis sukrosa yang dapat terjadi karena adanya perubahan kesetimbangan kimia baik pada lahan maupun pada tanaman itu sendiri.

Informasi penting yang telah diperoleh tersebut tentu saja hanya merupakan kontribusi sangat kecil dibandingkan dengan permasalahan yang begitu rumit dalam kaitannya dengan proses biologis yang terjadi. Kompleksitas permasalahan antara lain bahwa perbedaan jenis unsur hara yang tersedia mengakibatkan perbedaan kesetimbangan kimia yang mengarah pada perubahan aktivitas jalur metabolisme (Gambar 2.3). Oleh karena

itu, unsur hara apa yang perlu diberikan untuk memelihara kesetimbangan kimia sedemikian rupa agar jalur metabolisme sesuai dengan pertumbuhan yang optimal, masih merupakan permasalahan yang cukup mendasar.

Pada tahap kedua dari pengembangan uji diagnostik, yang dilakukan pada tahun kedua ini, dimaksudkan untuk mengetahui perubahan biosintesis sukrosa setelah pemberian unsur hara NPK. Dalam jangka panjang, uji diagnostik ini bertujuan untuk mengetahui apakah kekurangan beberapa jenis unsur hara dapat diatasi hanya dengan penambahan unsur hara tersebut ataukah harus melalui mekanisme lain seperti sistem padi-palawija. Sebagai perbandingan, dalam ilmu farmasi telah diketahui bahwa perbaikan suatu fungsi tidak dapat dilakukan hanya dengan menambahkan jenis senyawa yang kurang. Situasi ini dikenal dengan istilah “chemical equivalence belum dapat menjamin therapeutic equivalence” (Budi et al. 1990). Hal ini terutama sangat menarik karena seperti telah dikemukakan di atas bahwa kesetimbangan kimia dapat mengubah jalur metabolisme yang dapat bersifat reversible atau mungkin irreversible sehingga penambahan unsur hara yang kurang bisa saja tidak memperbaiki pertumbuhan (therapeutic). Dengan demikian, untuk dapat memelihara pertanian berkelanjutan diperlukan adanya metode diagnostik status unsur hara yang cukup sensitive untuk menunjukkan perubahan tambahan unsur hara yang diperlukan.

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Umum

Masyarakat dunia termasuk Indonesia dihadapkan pada berbagai permasalahan meliputi perubahan cuaca global yang populer dengan sebutan pemanasan global, rawan pangan, kerusakan lingkungan dsbnya, yang menghendaki perhatian serius semua lapisan masyarakat. Perguruan tinggi sebagai lembaga ilmiah memiliki tanggung jawab moral untuk secara aktif mengkaji permasalahan tersebut sehingga umat manusia dapat terhindar dari situasi yang lebih serius. Situasi ini yang kemudian mendorong dilakukannya beberapa penelitian, pada dasarnya dimaksudkan untuk menemukan suatu cara penanggulangan masalah-masalah yang diakibatkan baik langsung maupun tidak langsung oleh perubahan cuaca global dan kerusakan lingkungan tersebut.

Salah satu penelitian yang telah dilakukan adalah perubahan biosintesis sukrosa sebelum terjadinya pertumbuhan pada stek tanaman panili. Pada penelitian ini, kondisi pertumbuhan diubah dengan pemberian unsur hara fosfat dengan dosis tinggi, sebagai simulasi terhadap situasi pencemaran lingkungan berupa akumulasi unsur fosfat. Pemberian fosfat dengan kadar tinggi ini sangat jelas mengakibatkan hambatan pertumbuhan pada tanaman panili. Pengujian lebih lanjut pada biosintesis sukrosa menemukan bahwa pada tumbuhan yang diberi fosfat kadar tinggi terjadi penurunan biosintesis sukrosa yang kemungkinan diakibatkan oleh terjadinya akumulasi ion fosfat yang tinggi pada daun sehingga pH sitosol tidak optimal untuk memelihara lingkungan agar dapat terjadi pemanenan energi sinar matahari yang optimal. Hasil penelitian ini kemudian menunjukkan perlunya monitoring atau uji diagnostik terhadap pemakaian bahan sintetis pada tumbuhan terutama dalam pemberian pupuk. Uji diagnostik ini terutama dimaksudkan untuk menghindari terjadinya pemborosan terhadap pemakaian sumber alam yang tidak dapat diperbaharui (nonrenewable resources) dan menghindari kerusakan lingkungan yang selanjutnya dapat mengakibatkan kerusakan hasil panen dan terutama yang mengarah pada terjadinya rawan pangan bagi penduduk dunia.

3.2 Tujuan khusus penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk melakukan uji diagnostik sukrosa terhadap tumbuhan panili yang dibudidayakan di kawasan penyangga hutan Gunung Batukaru yang terletak sekitar 1 km dari batas hutan (Foto 1). Melalui observasi perubahan biosintesis sukrosa, uji diagnostik ini diharapkan dapat mengestimasi apakah pemberian pupuk NPK pada dosis yang ditentukan sesuai dengan jumlah maupun jenis unsur yang diperlukan.

3.3 Urgensi penelitian

Pertanian berkelanjutan sudah banyak diwacanakan, tetapi beberapa masalah pokok yang menyangkut produksi berkelanjutan masih memerlukan perhatian yang lebih banyak. Salah satu masalah pokok tersebut adalah metode penilaian terhadap status nutrisi tumbuhan. Oleh karena setiap kali panen akan terjadi pengurangan beberapa jenis unsur hara pada lahan dan pengurangan ini kemudian diimbangi dengan pemberian pupuk, maka monitoring terhadap unsur hara ini sangat perlu dilakukan agar pemberian tambahan unsur hara sesuai dengan keperluan tanaman.

Saran yang lebih baik tentang pemupukan akan dapat dibuat apabila beberapa indikator ketersediaan nutrisi telah diketahui. Indikator ini biasanya diperoleh melalui beberapa observasi yaitu analisis daun, symptom defisiensi, uji tanah dan catatan tentang hasil panen. Namun demikian, indikator tersebut masih sangat sulit digunakan sebagai pedoman pemupukan karena kompleksitas mekanisme penyerapan unsur hara dan kompleksitas mekanisme penyediaan unsur hara didalam tanah. Oleh karena itu diperlukan metode diagnostik yang lebih sederhana dan dapat memberikan informasi yang lebih mendekati kebutuhan tanaman secara langsung terutama untuk menghasilkan sukrosa yang merupakan molekul penyusun berbagai senyawa fungsional maupun senyawa struktural didalam tumbuhan. Masalah ini nampaknya belum banyak mendapat perhatian terutama untuk tanaman panili (*Vanilla planifolia*) sehingga produksi berkelanjutan komoditas ini mengalami banyak masalah.

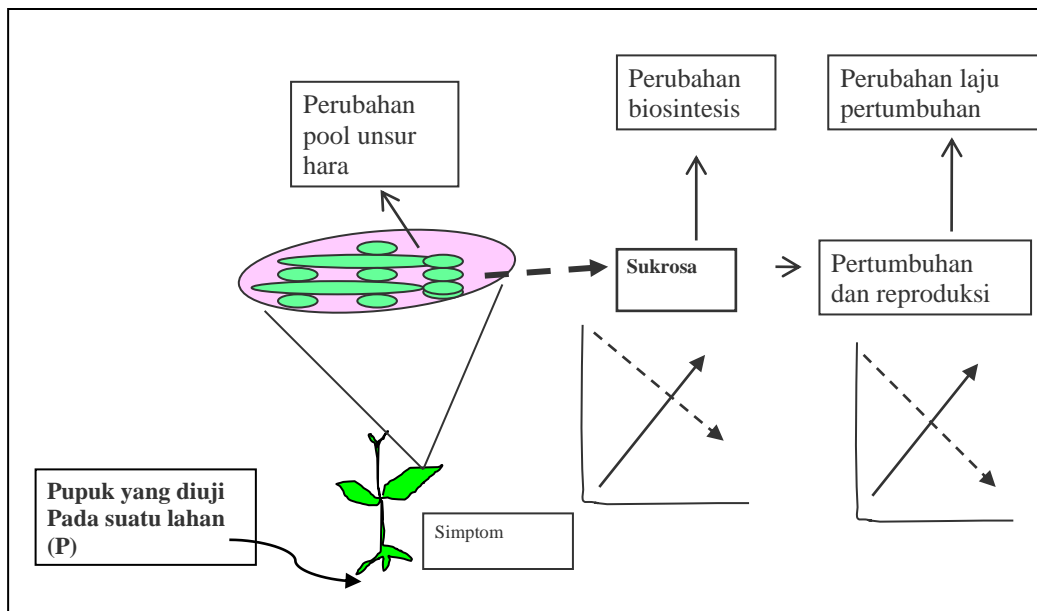


Foto 1. Batas kawasan penyangga hutan Gunung Batukaru.

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1 Pendahuluan

Perubahan biosintesis sukrosa sebelum pertumbuhan pada penelitian tahap II ini diarahkan untuk mengetahui status nutrisi tumbuhan sehingga unsur hara tambahan yang masih diperlukan dapat diketahui secara lebih baik. Identifikasi terhadap status nutrisi pada tanaman, yang biasa menggunakan analisis jaringan, dikenal juga dengan diagnosis. Akan tetapi, berbeda dengan diagnosis analisis jaringan, uji diagnostik pada penelitian ini dilakukan dengan pemberian sejumlah pupuk pada suatu dosis terhadap sejumlah tanaman yang dilanjutkan dengan pengukuran biosintesis sukrosa. Didalam tumbuhan, pupuk tersebut akan mengakibatkan perubahan pools unsur hara yang selanjutnya mempengaruhi perubahan sintesis sukrosa atau laju pertumbuhan. Jadi variable bebas pada penelitian ini berupa pupuk dan variable alternatif berupa biosintesis sukrosa dan pertumbuhan kuncup ketiak. Secara skematis, kemungkinan perubahan yang terjadi pada tumbuhan setelah pemberian pupuk adalah seperti terlihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Perubahan biosintesis sukrosa yang dapat terjadi setelah pemberian pupuk.

Perubahan variable alternatif yang berupa kadar sukrosa pada tanaman panili diuji menggunakan "pretest – posttest kontrol group desain". Dengan desain ini maka kadar

sukrosa diukur minimal 2 X yaitu pada saat diberi pupuk (T0) dan setelah diberi pupuk (T1). Sebagai pembanding, maka pengukuran sukrosa juga dilakukan pada tanaman yang tidak diberi pupuk (kontrol). Hasil pengukuran ini selanjutnya dapat digunakan untuk melakukan estimasi status nutrisi tumbuhan dengan beberapa anggapan dasar sbb:

Apabila unsur hara yang diberikan mengakibatkan penurunan laju biosintesis, maka pupuk tersebut dianggap tidak sesuai dengan keperluan tumbuhan walaupun berdasarkan symptom defisiensi perlu ditambahkan. Akan tetapi apabila pemberian pupuk mengakibatkan kenaikan laju biosintesis sukrosa, maka pupuk tersebut dianggap perlu walaupun tumbuhan belum menunjukkan symptom defisiensi terhadap unsur tersebut.

4.2 Desain penelitian

Penelitian yang dilakukan ini menggunakan rancangan acak kelompok dengan 4 perlakuan yaitu Urea, TSP, KCl dan kontrol, dilakukan pada 2 kelompok penelitian lapangan yaitu kelompok I dan kelompok II. Sukrosa yang diobservasi dibedakan lagi menjadi kadar gula pada daun dan kadar gula pada batang (internode). Oleh karena itu, desain penelitian dapat digambarkan seperti pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Desain penelitian untuk mengetahui kadar sukrosa setelah pemberian pupuk N, P, K, secara diagnostik.

Eksperiment	Kadar sukrosa (mg/dl)							
	Daun				Batang			
	Kontrol	Urea	TSP	KCl	Kontrol	Urea	TSP	KCl
I								
II								

4.3 Kondisi pertumbuhan pohon induk panili dan cara pemberian pupuk

Expt. 1. Pemupukan pada pohon induk di perkebunan

Panili yang digunakan sebagai subjek penelitian ditumbuhkan pada lahan multikultur yang terdiri a.l. dari pohon coklat, kopi, pisang dll. Jadi pohon panili ini tidak khusus dipelihara untuk perkebunan panili monokultur. Lahan ini terletak di kawasan penyangga hutan Gunung Batukaru dengan ketinggian tempat sekitar 800 m dpl.

Stump yang digunakan untuk pohon panili ini juga terdiri dari berbagai spesies terutama gamal, dadap dan lamtoro. Pada lahan tempat ditumbuhkannya pohon induk panili ini juga dipelihara paku-pakuan untuk menjaga kelembaban lahan pada musim kering dan air tidak menggenang pada musim hujan(Foto 2). Hal ini dimungkinkan karena porositas dari lahan yang ditumbuhi akar paku-pakuan.



Foto.2. Kondisi pertumbuhan pohon induk panili di salah satu perkebunan yang terletak di kawasan penyangga hutan Akan tetapi untuk memudahkan pemberian pupuk ,maka pada penelitian ini dilakukan pembersihan disekitar pohon panili terutama pemangkasan stump dan paku-pakuan seperlunya. Pohon induk panili yang telah berumur lebih dari 5 tahun diberi pupuk Urea, TSP dan KCl masing-masing dengan dosis 9.25, 1.1 dan 4.6 g/pohon yang dibeli dari

warung pertanian. Pemberian dosis pupuk ini didasarkan pada analisis HK Deinum yang dikutip oleh Rismunandar (1989, h. 31). Oleh karena tanaman panili yang telah berumur lebih dari 5 tahun memiliki penyebaran akar yang relative luas, maka pupuk dengan dosis tersebut diberikan dalam bentuk larutan, yaitu 9.25 g Urea/l/pohon, 1.1 g TSP/l/pohon dan 4.6 g KCl/l/pohon panili. Untuk melihat konsistensi respon tumbuhan terhadap pemberian pupuk tersebut, penelitian lapangan ini dilakukan minimal 2 tahap yaitu tahap 1 menggunakan dosis standard dan tahap 2 menggunakan dosis 2 kali dosis standard. Tanaman panili yang digunakan sebagai kontrol diperlakukan sama kecuali tidak diberi pupuk.

Expt.2. Pemupukan pada tanaman panili yang ditumbuhkan dalam pots

Bibit panili yang telah berumur 8 bulan dipindahkan dari polibag ke pot plastic dengan volume 1.5 l. Medium pertumbuhan yang digunakan adalah top soil dari lahan perkebunan. Setelah bibit tersebut menghasilkan beberapa daun baru, kemudian diberikan pupuk seperti pada experiment 1 yaitu: Urea, TSP dan KCl. Konsentrasi unsur yang diberikan pada experiment 2 ini disesuaikan dengan konsentrasi yang dapat menunjukkan perubahan pertumbuhan seperti yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti pada tanaman lain (Tab. 4.2).

Tabel 4.2. Dosis pemberian pupuk N, P, K pada beberapa penelitian

No	Unsur	Konsentrasi	Peneliti
1	Phosphorus	54.0 mmol/m ³ = 0.054 mmol/liter Note: 1 m ³ = 1000 liter	Bates and Lynch 2000
2	Nitrogen	16 mM	Barneix et al. 1992
3	Pottassium	0.3 mM	Liu et al. 2006

Dengan berpedoman pada konsentrasi unsur hara tersebut, jumlah pupuk yang diberikan pada tiap perlakuan dapat dihitung sbb:

1. Unsur hara phosphorus.

Pupuk yang digunakan adalah TSP (P_2O_5).

1 mol TSP = 2 mol phosphorus. 0.054 mM phosphorus =

$$\frac{0.054 \text{ mM}}{2} TSP = 0.027 \text{ mM TSP} = 0.027 \times 111 \text{ mg/l} = 2.997 \text{ mg/l}$$

2. Unsur hara nitrogen

Pupuk yang digunakan adalah Urea.

1 mol Urea $CN_2H_4O = 2 \text{ mol N}$

16 mM nitrogen = 8 mM Urea = $8 \times 60 \text{ mg/l} = 480 \text{ mg/l}$

3. Unsur hara potassium

Pupuk yang digunakan adalah KCl

1 mol KCl = 1 mol potassium

0.3 mM potassium = 0.3 KCl = $0.3 \times 74.5 \text{ mg/l} = 22.65 \text{ mg/l}$

Untuk lebih mudah penimbangan, sebelum dibuat larutan sesuai konsentrasi yang diperlukan, terlebih dahulu dibuat larutan stok (Stock solution). Larutan stok ini memiliki konsentrasi pupuk yang dapat ditimbang. Untuk mendapatkan konsentrasi sesuai larutan yang diperlukan maka larutan stok ini kemudian diencerkan. Perhitungan yang digunakan untuk pengenceran ini dapat dilihat pada gambar dibawah ini (Gambar 4.2).

Stock solution	
TSP 27 mM	= 27 x 111 mg/l = 2997 mg/l = 3000 mg/l
Urea 80 mM	= 80 x 60 mg/l = 4800 mg/l
KCl 30 mM	= 30 x 74.5 mg/l = 2235 mg/l
Pengenceran stock solution ,enjadi larutan sesuai dosis yang diperlukan.	
TSP 27 mM	→0.027 mM 1000 ml
	27 x = 27 ml
	x = 1 ml
Urea 80 mM	8 mM 1000 ml
	80x = 8000 ml
	X = 100 ml
KCl 30 mM	0.3 mM 1000 ml
	30x = 300 ml
	X = 10 ml

Gambar 4.2. Pembuatan larutan stok (stock solution) dan pengencerannya sesuai dosis yang diperlukan yaitu TSP 0.027 mM, Urea 8 mM, KCl 0.3 mM.

4.4 Transplantasi stek panili

Sebelum dilakukan pemanenan stek untuk ditransplantasi, tumbuhan induk panili disampel beberapa kali untuk mengetahui perubahan biosintesis sukrosa sebagai respon tumbuhan setelah pemberian pupuk. Sampling ini dilakukan pada hari yang sama dengan hari pemberian pupuk (T0), 10 hari setelah pemberian pupuk (T1) dan 20 hari setelah pemberian pupuk (T2). Pemanenan stek untuk mengamati pertumbuhan bibit kemudian dilakukan setelah sampling pada T2. Dengan demikian maka perubahan biosintesis sukrosa dapat diketahui sebelum terjadinya pertumbuhan kuncup ketiak pada stek panili. Panjang stek yang dipanen sekitar 1 m dari apeks. Stek ini dijadikan stek pendek dengan 2 nodus dan kemudian ditransplantasi ke tempat pembibitan yang dibuat sedemikian rupa dengan tinggi atap sekitar 1 m dari medium pertumbuhan. Atap tempat pembibitan ini adalah telonet, yang berfungsi untuk menghindarkan panili dari terkena sinar matahari langsung. Medium pertumbuhan yang digunakan adalah humus (top soil) yang diambil dari lahan yang memiliki vegetasi lamtoro Gung.

Untuk menghindarkan terjadinya kekeringan, maka dilakukan penyiraman menggunakan metode “drip irrigation” (metode tetesan) dengan menempatkan container penampung air setinggi sekitar 1.5 m kemudian disalurkan melalui pipa ke atas medium

pertumbuhan. Pipa yang terletak di atas medium pertumbuhan diberi perforasi, sementara jumlah air yang dialirkan diatur dengan keran dan ditempatkan pada posisi agar aliran air mencapai tingkat “drip irrigation” (Foto 3 a dan b).



Foto 3 a. Tempat penumbuhan stek panili yang dibuat dengan atap dari telonet dengan tinggi sekitar 1 m. Stek ditransplantasi ke medium pertumbuhan dari top soil yang ditempatkan didalam polibag.

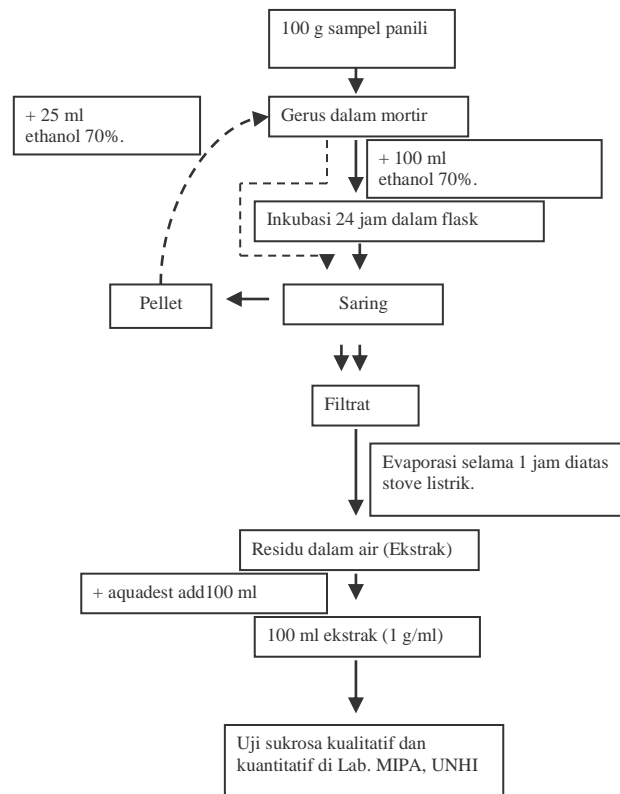


Foto 3 b. Drip irrigatin yang digunakan untuk menyiram stek panili apabila diperlukan, terutama pada cuaca kering.

4.5 Ekstraksi sukrosa pada tanaman panili

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode yang ditemukan pada penelitian tahap I yaitu berupa modifikasi metode ekstraksi gula yang digunakan oleh Foley et al. 1992. Sejumlah sampel tanaman panili, yang berupa daun dan batang,

digerus dalam mortar lalu dimasukkan dalam glass Erlenmeyer yang telah diisi alkohol 70% sebanyak 100 ml. Campuran ini diinkubasi selama 24-36 jam pada suhu kamar sebelum disaring dengan kapas dan filtrat ditampung dalam 8 Becker glass yaitu untuk sampel daun dan batang tumbuhan yang diberi Urea, TSP, KCl dan kontrol. Pellet dari masing-masing sampel digerus kembali dalam mortar dengan penambahan alkohol 70% sebanyak 25 ml sebelum disaring dan filtratnya dikumpulkan dalam Becker glass. Kumpulan filtrat ini kemudian diuapkan diatas kompor listrik atau hot plate selama sekitar 1 jam pada pemanasan rendah. Residu yang larut dalam air kemudian ditambahkan aquadest sebanyak yang diperlukan agar konsentrasi ekstrak menjadi 1 g FW/ml. Secara skematis, metode ekstraksi dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3. Metode ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili.

4.6 Identifikasi dan kuantifikasi sukrosa pada sampel tumbuhan panili

Analisa kualitatif terhadap ekstrak dilakukan menggunakan modifikasi metode yang dikemukakan oleh Estien Yazid dan Lida Nursanti (2006) sbb: Pipet 5 ml ekstrak

kedalam tabung reaksi sebelum ditambahkan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Ekstrak ini kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan dalam suhu kamar. Setelah dingin, kelebihan asam kemudian dinetralkan dengan NaOH 2%. Untuk pengujian gula, 5 tetes ekstrak yang telah dihidrolisa ini kemudian ditambahkan 15 tetes pereaksi Benedict dan kemudian dipanaskan diatas air mendidih selama 5 menit. Setelah didinginkan, perubahan warna pada ekstrak ini lalu di observasi. Penentuan kadar dilakukan dengan mmbandingkan warna endapan pada larutan ekstraks dengan warna endapan yang ada pada larutan standard.

4.6.1 Pembuatan larutan standard sebagai pembanding

Untuk mengetahui kadar sukrosa secara kualitatif pada sampel, maka digunakan larutan sukrosa autentik sebagai pembanding. Konsentrasi larutan pembanding ini adalah 0.00, 0.5, 1, 1.5, 2 %. Larutan ini dihidrolisa dan direaksikan dengan pereaksi Benedict menggunakan prosedur seperti pada hidrolisa dan uji gula pada sampel. Warna endapan yang terbentuk kemudian diberi skor menggunakan pedoman yang sering dipakai dalam uji klinik (Gandasoebrata 2007) sbb:

Konsentrasi (%)	Warna endapan	Katagori klinis (skor)
<0.5	Biru jernih atau sedikit agak kehijauan	Negatif
0.5-1	Hijau kekuning-kuningan dan keruh	Positif 1 (1+)
1-1.5	Kuning keruh	Positif 2 (2+)
2-3.5	Jingga atau warna lumpur	Positif 3 (3+)
3.5<	Merah keruh	Positif 4 atau 4+

4.6.2 Penentuan kadar sukrosa secara kualitatif

Identifikasi larutan sukrosa autentik standard (Tabel 4.3) dan sukrosa pada sampel (Tabel 4.4) menggunakan langkah-langkah yang sama. Warna endapan yang terjadi pada ekstraks, setelah pemanasan selama 5 menit dengan pereaksi Benedict, lalu dibandingkan dengan warna endapan yang timbul pada larutan standard. Konsentrasi sukrosa pada ekstrak kemudian dapat diketahui dengan melihat perbandingan intensitas warna pada kedua larutan yang diuji (larutan ekstrak dan larutan pembanding). Dengan cara ini maka kadar sukrosa pada ekstrak kemudian dapat diestimasi dan dinyatakan sebagai estimated sucrose concentration (Est. Suc. Conc.). Uji kualitatif terhadap sukrosa pada sampel kemudian dapat dilanjutkan dengan uji kuantitatif. Salah satu uji yang dapat digunakan adalah uji glukosa terhidrolisa dengan spektrofotometer seperti metode Nelson Somogyi.

Tabel 4.3. Uji sukrosa pada larutan standard (larutan pembanding) secara tidak langsung melalui uji glukosa dengan pereaksi Benedict setelah dihidrolisa dengan HCl.

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)				
	Air	Larutan sukrosa authentic (%)			
		0.5	1	1.5	2
	5	5	5	5	5
HCl (tetes)	5	5	5	5	5
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan					
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Dan volume diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga terjadi pengenceran sebanyak 50%				
Identifikasi glukosa, hasil hidrolisa sukrosa, dengan uji Benedict					
Larutan standard terhidrolisa (tetes)	5	5	5	5	5
Pereaksi Benedict (tetes)	15	15	15	15	15
Didihkan diatas penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan secara perlahan					
HASIL					
WARNA	Biru jernih	Biru jernih atau sedikit agak kehijauan	Hijau kekuningan	Kuning keruh	Jingga atau warna lumpur
NILAI	-	-	1+	2+	3+
No. Tabung	1	2	3	4	5

Tabel 4.4. Uji Sukrosa secara tidak langsung melalui uji glukosa dengan pereaksi Benedict setelah dihidrolisa dengan HCl pada sampel tanaman panili yang diekstraksi dengan alkohol 70%.

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
HCl (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan									
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Dan volume diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga terjadi pengenceran sebanyak 50%								

Identifikasi glukosa, hasil hidrolisa sukrosa, dengan uji Benedict									
Bahan uji Ekstrak panili 0.5 g FW/ml (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pereaksi Benedict (tetes)	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Didihkan diatas penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan secara perlahan									
HASIL									
WARNA									
NILAI									
No. Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9

4.6.3 Penentuan kadar sukrosa secara kuantitatif pada ekstrak tanaman panili

Untuk mengetahui kadar sukrosa secara kuantitatif, yang terdapat pada tanaman panili yang diberi berbagai jenis pupuk, digunakan spektrofotometer. Langkah-langkah pokok pengukuran mirip dengan uji kualitatif yaitu dimulai dengan pembuatan larutan standard yang diikuti dengan pengujian sampel. Larutan standard digunakan untuk membuat kurve standard dan kurve ini selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar sukrosa pada sampel. Pengukuran ini menggunakan metode Nelson-Somogyi yang diuraikan oleh Estien Yazid dan Lisda Nursanti (2006) sbb:

A. Pembuatan kurve standard

Oleh karena dasar yang digunakan untuk mengukur sukrosa ini adalah pengujian glukosa, maka larutan sukrosa standard yang digunakan mula-mula dihidrolisa dengan HCl seperti prosedur yang diuraikan diatas, 5 ml larutan ditambahkan 5 tetes HCl pekat kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit. Setelah didinginkan, ekstrak kemudian dinetralkan dengan NaOH 2%. Secara lebih lengkap tahap pengujian sukrosa standard dapat dilihat pada tabel berikut (Tabel 4.5):

Tabel 4.5. Langkah-langkah pengukuran sukrosa secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer.

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)				
	Air	Sukrosa authentic (mg/100 ml)			
		500	1000	1500	200
	5	5	5	5	5
HCl	5	5	5	5	5

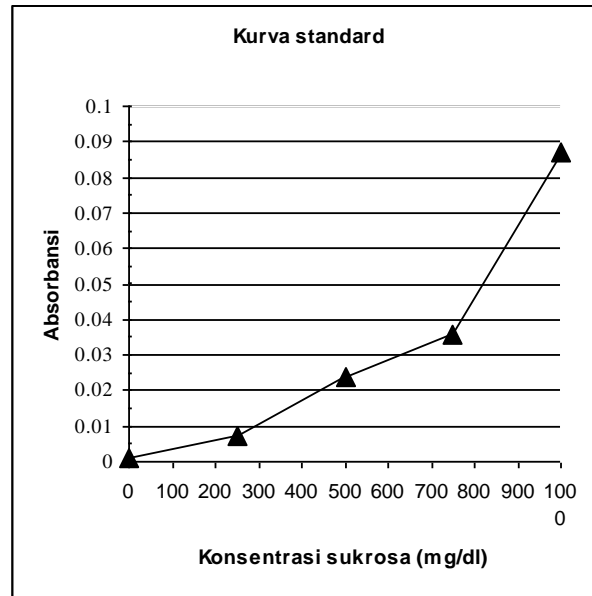
(tetes)					
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan					
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5 ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Volume akhir diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga didapat gula terhidrolisa dengan konsentrasi 250, 500, 750 dan 100 mg/100 ml.				
Uji Kuantitatif sukrosa					
	Equivalent konsentrasi Glukosa terhidrolisa (mg/100 ml)				
	0.00	250	500	750	1000
Bahan uji (ml)	1	1	1	1	1
Pereaksi Nelson(ml)	1	1	1	1	1
Panaskan semua tabung dalam penangas air mendidih selama 20 menit					
Dinginkan secara bersama-sama dengan memasukkannya kedalam glass kimia yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C					
Arsenomolibdat (ml)	1	1	1	1	1
Kocok sampai semua endapan Cu ₂ O larut kembali, menggunakan vortex mixer					
Setelah endapan Cu ₂ O larut semua, tambahkan 7 ml aquadest dan kocok sampai homogen.					
Baca absorbansi (ABS) pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Kemudian buat kurva standard yang menunjukkan hubungan antara kadar glukosa terhidrolisa dan absorbansi.					

Kadar larutan sukrosa standard “terhidrolisa” dan absorbansi

Oleh karena pada proses hidrolisa dilakukan penambahan larutan NaOH dan volume diatur menjadi 10 ml, maka konsentrasi setelah hidrolisa menjadi lebih encer dengan faktor pengenceran sebesar $\frac{5}{10} \times 100\% = 50\%$. Dengan demikian maka sukrosa yang sebelumnya dibuat dengan konsentrasi 1 % akan menjadi 0.5%. Konsentrasi larutan sukrosa yang telah dihidrolisa ini kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer. Untuk lebih jelasnya, maka konsentrasi sukrosa sebelum dihidrolisa dan setelah hidrolisa serta hasil pengukuran sukrosa terhidrolisa akan diberikan pada tabel 4.6.

Tabel 4.6. Tabel pencatatan data absorbansi dari larutan standard setelah dihidrolisa.

No	Kadar larutan sukrosa sebelum dihidrolisa (%)	Kadar larutan sukrosa setelah dihidrolisa (%)	Absorbansi pada = $\lambda 540$
1	0.5	0.25	
2	1	0.5	
3	1.5	0.75	
4	2	1	



Gambar 4.4 Contoh kurve standard yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi pada larutan standard yang digunakan untuk melakukan estimasi terhadap konsentrasi sukrosa pada larutan sampel.

Setelah absorbansi dari masing-masing larutan diukur maka dibuat kurve standard yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi. Contoh kurve standard yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi larutan autentik standard yang digunakan untuk melakukan estimasi terhadap kadar sukrosa pada sampel (Gambar 4.4)

Cara lain untuk menggambarkan hubungan antara kadar sukrosa dan absorbansi adalah dengan menggunakan persamaan Least-Squares yang menjelaskan satu garis lurus dengan rumus $X = aY + b$.

Keterangan:

X (absis) = kadar larutan sukrosa standard (%)

Y (ordinat) = Absorbansi

A dan b = tetapan yang dihitung dari persamaan:

$$a = \frac{N(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{N(\sum Y^2) - (\sum Y)^2}$$

$$b = \frac{(\sum Y^2)(\sum X) - (\sum Y)(\sum XY)}{N(\sum Y^2) - (\sum Y)^2}$$

Data absorbansi dan konsentrasi larutan standard kemudian dapat dimasukkan kedalam persamaan tersebut melalui pembuatan tabel (Tabel 4.7).

Tabel 4.7. Tabulasi data untuk menghitung konsentrasi larutan contoh menggunakan persamaan least-squares $X=aY+b$

No	Kadar larutan sukrosa standarad dalam prosen (X)	Absorbansi (Y)	XY	Y ²
1	0.25			
2	0.5			
3	0.75			
4	1			
$\sum N=4$	$\sum X=2.5$	$\sum Y$	$\sum XY$	$\sum Y^2$

Dari tabel 4.7. diatas, a dan b dapat dihitung dan hasil perhitungan ini dapat digunakan untuk membuat persamaan regresi-linier: $X = \dots Y + \dots$

B. Pengukuran kadar sukrosa pada sampel

Kadar gula yang belum diketahui misalnya ekstrak panili yang diteliti dapat dihitung dengan persamaan Least-squares $X = aY + b$ tersebut melalui pengukuran absorbansi. Contoh perhitungan kadar gula pada suatu sampel menggunakan persamaan Least-squares setelah mengetahui absorbansinya (Tabel 4.8):

Tabel 4.8. Contoh tabel statistik untuk menghitung nilai a dan b dalam persamaan $X = aY + b$. Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menghitung konsentrasi suatu senyawa dalam larutan sampel setelah mengetahui absorbansinya.

No	Sukrosa standard mg/dl (X)	Absorbansi (Y)	XY	Y ²
1	2	0.1	0.2	0.001
2	4	0.1	0.8	0.04

3	6	0.3	1.8	0.09
4	8	0.4	3.2	0.16
5	10	0.5	5	0.25
6	20	1.2	24	1.44
7	40	2.4	96	5.76
8	60	3.6	216	12.96
$\Sigma N=8$	$\Sigma X=150$	$\Sigma Y=8.7$	$\Sigma XY=347$	$\Sigma Y^2=12.96$

$$a = \frac{N(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{N(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2} = \frac{1471}{89.99} = 16.34$$

$$b = \frac{(\Sigma Y^2)(\Sigma X) - (\Sigma Y)(\Sigma XY)}{N(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2} = \frac{87.6}{89.99} = 0.973441$$

Soal

1. Umpama absorbansi (Y) suatu sampel = 0.45, berapakah konsentrasi (X) ?

$$X = aY + b = (16.34 \times 0.45) + 0.97 = 8.323$$

2. Ump. Absorbansi = 0.5, berapakah konsentrasinya?

$$X = (16.34 \times 0.5) + 0.97 = 9.14$$

4.7 Analisa data

Data hasil pengukuran terhadap kadar sukrosa pada tumbuhan, setelah diberikan berbagai jenis pengayaan unsur hara, akan dianalisa dengan ANOVA menggunakan program SPSS. Analisa ini dimaksudkan untuk menguji hipotesa nol yang dirumuskan tidak ada perbedaan kadar sukrosa pada tumbuhan yang diberi berbagai pengayaan unsur hara. Untuk tujuan ini, beberapa tahap penting yang perlu dilakukan antara lain data entri dan data analisis:

Contoh: Dari 6 kali pemanenan stek terhadap tanaman panili yang diberi pupuk NPK didapat data sebagai berikut (data contoh ini dimodifikasi dari Palguna AAB, 1986, h. 329).

Pemanenan	Kadar sukrosa pada ekstrak tanaman panili (mg/g FW)			
	kontrol	Urea	TSP	KCl
1	45	40	30	25
2	40	42	37	26

3	46	38	26	31
4	38	42	25	21
5	35	45	27	26
6	43	48	35	28

4.1.1. Data entri

Untuk dapat dianalisa dengan ANOVA pada SPSS maka data dimasukkan dengan susunan seperti pada tabel 4.9. Pada tabel ini terdapat sebuah dependent variable yaitu kadar sukrosa dan 2 buah independent variable yaitu pupuk dan pemanenan stek. Data yang tercantum dalam tabel 4.9 ini adalah data contoh dan bukan data sebenarnya.

Tabel 4.9. Contoh entri data kadar sukrosa kedalam tabel data SPSS.

Pupuk	Pemanenan stek	Kadar sukrosa (mg/g FW)
Kontrol	1	45.00
Urea	1	40.00
TSP	1	30.00
KCl	1	25.00
Kontrol	2	40.00
Urea	2	42.00
TSP	2	37.00
KCl	2	26.00
Kontrol	3	46.00
Urea	3	38.00
TSP	3	26.00
KCl	3	31.00
Kontrol	4	38.00
Urea	4	42.00
TSP	4	25.00
KCl	4	21.00
Kontrol	5	35.00
Urea	5	45.00
TSP	5	27.00
KCl	5	26.00
Kontrol	6	43.00
Urea	6	48.00
TSP	6	35.00
KCl	6	28.00

b. Data analisis

Entri data seperti contoh diatas kemudian dianalisa menggunakan SPSS yang diuraikan dalam buku Aplikasi analisis multivariate dengan program SPSS (Ghozali, H.I. 2007). Dengan menganalisa data yang dimasukkan dalam susunan seperti pada tabel 4.9 maka akan didapat tabel anova seperti diperlihatkan dalam tabel 4.10. Tabel analisis of variant

untuk mengetahui signifikansi perbedaan rata-rata produksi sukrosa setelah diberi pupuk N, P, K secara diagnosis.

Tabel 4.10. Tabel analisis of variant untuk mengetahui signifikansi perbedaan rata-rata produksi sukrosa setelah diberi pupuk Urea, TSP dan KCl secara diagnostik.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: VAR00003

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	30630.542(a)	9	3403.394	235.846	.000
VAR00001	1183.792	3	394.597	27.345	.000
VAR00002	116.708	5	23.342	1.618	.216
Error	216.458	15	14.431		
Total	30847.000	24			

a R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .989)

Dengan melihat hasil F hitung maka dapat diketahui bahwa kadar sukrosa berbeda pada masing-masing perlakuan yang diberikan. Jadi pada contoh ini hipotesa nol dapat ditolak. Uji lanjutan kemudian dapat dilakukan untuk melihat perbandingan antar perlakuan menggunakan LSD (least significant different). Pada uji LSD ini dapat dilihat perlakuan yang berbeda secara signifikan dengan perlakuan yang lain (Tabel 4. 11).

Tabel 4.11. LSD test untuk mengetahui perbandingan signifikansi rata-rata produksi sukrosa antar perlakuan.

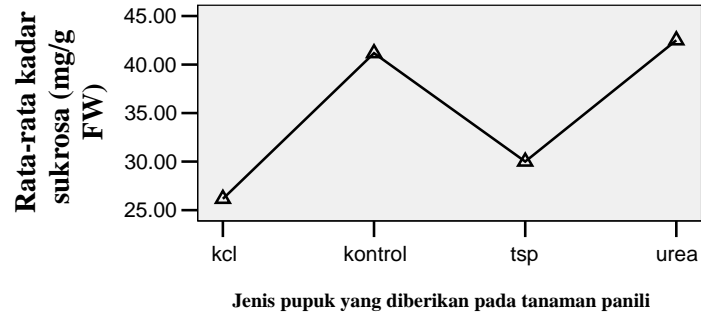
LSD

kcl	kontrol	-15.0000(*)
	tsp	-3.8333
	Urea	-16.3333(*)
kontrol	kcl	15.0000(*)
	tsp	11.1667(*)
	Urea	-1.3333
tsp	kcl	3.8333
	kontrol	-11.1667(*)
	Urea	-12.5000(*)
Urea	kcl	16.3333(*)
	kontrol	1.3333
	tsp	12.5000(*)

Based on observed means.

- The mean difference is significant at the .05 level.

Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dalam grafik maka hasil uji sukrosa yang dilakukan terhadap panili yang diberi pupuk N, P dan K maka dapat ditampilkan dalam grafik sbb:



Gambar 4.5. Model data diagnostik yang akan dikumpulkan untuk mengetahui jenis pemupukan yang diperlukan tumbuhan.

Dengan menggunakan kontrol sebagai standard, maka dari contoh data uji diagnostik ini (bukan data sebenarnya) dapat dilihat bahwa penambahan KCl dan TSP tidak memperbaiki laju biosintesis sukrosa yang berarti bahwa dua pupuk tersebut tidak perlu diberikan pada lahan dimana tumbuhan dibudidayakan. Sedangkan unsur hara yang diperlukan hanyalah Urea karena dapat menaikkan laju biosintesis. Dengan uji ini maka kemudian dapat melakukan kebijakan pemberian pupuk pada lahan tersebut untuk memperbaiki pertumbuhan.

BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian Experiment 1.

5.1.1 Pengambilan sampel dan ekstraksi sukrosa

Daun muda biasanya mengimport hasil asimilasi karbon yang berupa sukrosa sampai daun tersebut mencapai pertumbuhan 50%. Setelah daun mencapai pertumbuhan 100%, produksi sukrosa biasanya melebihi jumlah yang diperlukan sehingga daun dewasa kemudian menjadi pengeksport sukrosa (Leopold and Kriedemann 1979, Larson and Gordon 1969). Disamping hasil asimilasi karbon, daun muda juga menjadi pengimport hasil asimilasi unsur lain, terutama yang didapat tumbuhan melalui akar (Pate 1980, Smith 1979, Adiputra and Anderson 1992). Atas pertimbangan distribusi dan redistribusi hasil asimilasi ini, maka sampel tanaman yang digunakan untuk memonitor perubahan biosintesis sukrosa, setelah pemberian tambahan unsur hara N P K, adalah stek tanaman yang masih muda yaitu mulai dari nodus 7 sampai ke apeks. Stek ini memiliki berbagai tingkat pertumbuhan daun yang dapat menjadi pengeksport atau pengimport hasil asimilasi sukrosa baru setelah pemberian unsur hara NPK. Akan tetapi, tumbuhan panili memiliki percabangan yang relative sedikit, sehingga tumbuhan untuk satu perlakuan jumlahnya sampai 4 pohon. Dengan demikian total jumlah pohon yang diberikan tambahan unsur hara adalah 12, terdiri masing-masing dari 4 pohon untuk N, P dan K.

Untuk memudahkan pengambilan sampel, sesuai perlakuan yang diberikan, maka pohon induk panili diberi label yang berisi tentang nomor pohon dan jenis pupuk yang diberikan (Tab. 5.1, Foto 4). Pemberian nomor ini dilakukan secara random sehingga pohon dengan nomor yang berdekatan tidak terdapat pada lokasi yang berdekatan. Pemberian pupuk pada pohon induk ini juga dilakukan secara random sehingga pupuk yang sama pada nomor yang berurutan tidak terdapat pada lokasi yang berdekatan. Pemberian perlakuan secara random ini dimaksudkan semata-mata untuk memenuhi asumsi bahwa lahan memiliki kondisi unsur hara yang sama.

Tabel 5.1. Pohon induk panili yang digunakan sebagai subjek penelitian, diberi label yang berisi nomor dan jenis pupuk yang diberikan (Ekspeimen 1). Pemberian pupuk dilakukan tgl, 25 Mei 2008.

Pohon induk panili	Unsur hara tambahan yang diuji		Waktu Pemanenan sampel setelah pemberian pupuk (hari)
	Jenis pupuk	Dosis(g/pohon)	
1	Urea	9.25	Hari H (T0)
2	Urea	9.25	10 hari (T1)
3	TSP	1.1	20 hari (T2)
4	TSP	1.1	Hari H (T0)
5	Urea	9.25	Hari H (T0)
6	TSP	1.1	10 hari (T1)
7	KCl	4.6	10 hari (T1)
8	KCl	4.6	20 hari (T2)
9	KCl	4.6	
10	KCl	4.6	Hari H (T0)
11	TSP	1.1	
12	Urea	9.25	20 hari (T2)

Dengan pemberian label ini maka kekeliruan pengambilan sampel dapat dihindarkan dan perubahan biosintesis sukrosa yang terjadi, setelah pemberian pupuk tersebut, lebih banyak menunjukkan jenis pupuk yang masih diperlukan tanaman.



Foto 4. Cara pemberian label pada pohon panili yang digunakan sebagai subjek penelitian.

Tabel 5.2. Langkah-langkah ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili pada pemanenan pertama (T0) pada expt. 1. Setelah dipisahkan menjadi daun dan batang, masing-masing sampel tanaman ditimbang dan dijadikan potongan kecil-kecil. Sampel ini kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam etanol 70% sebanyak 50 ml sebelum digerus dalam mortar. Sampel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam untuk selanjutnya disaring dan diuapkan untuk memisahkan alkoholnya. Volume ekstrak kemudian diatur dengan penambahan air untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak 1 g FW/ml. Pemanenan sampel T0 ini dilakukan pada hari yang sama dengan hari pemberian pupuk (25-5-2008).

Berat basah atau Fresh weight (g) sampel tanaman panili yang diambil dari masing-masing perlakuan							
Kontrol		Urea		TSP		KCL	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
40	19	23.2	12.5	27	10.8	36.3	18.6
Sampel tanaman panili ini dijadikan potongan kecil-kecil sebelum diinkubasi dalam etanol 70% sebanyak 50 ml							
50	50	50	50	50	50	50	50
Inkubasi selama 24 jam (26/5/2008-27/5/2008)							
Digerus dalam mortar, dibilas dengan alkohol 70% sebanyak 25 ml dan diinkubasi kembali selama 24 jam sebelum disaring dengan kapas untuk memisahkan ampas yang kasar.							
Dipanaskan pada pemanasan rendah dengan stove listrik untuk menguapkan alkoholnya. Filtrat yang ditempatkan dalam Becker glass ini diuapkan sampai mencapai volume kurang dari volume equivalent berat sampel. Setelah didinginkan, filtrat ini selanjutnya disentrifuge untuk memisahkan kotoran yang halus.							
Konsentrasi larutan diatur sebesar 1 g FW/ml dengan penambahan aquadest secukupnya. Dengan demikian volume akhir (ml) dari larutan ekstrak adalah seperti terlihat berikut ini:							
Kontrol		Urea		TSP		KCl	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
40	19	23.2	12.5	27	10.8	36.3	18.6

Pada pengambilan sampel ini, berat sampel tanaman (Fresh weight) yang diambil dari masing-masing perlakuan adalah bervariasi seperti terlihat pada tabel 5.2, 5.3 dan 5.4. Masing-masing sampel ini kemudian diekstrak dengan cara yang sama tetapi kemudian semua ekstrak dibuat memiliki konsentrasi 1 g FW/ml dengan cara penambahan aquadest secukupnya. Oleh karena itu volume ekstrak yang didapat pada hasil ekstraksi berbeda-beda sesuai dengan berat sampel yang diambil pada masing-masing perlakuan.

Tabel 5.3. Kecuali berat masing-masing sampel dan waktu pemanenan stek, langkah-langkah ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili pada pemanenan kedua (T1) sama dengan T0. Berat sampel tanaman panili pada T1, dari masing-masing perlakuan unsur hara disajikan dalam tabel. Pemanenan sampel T1 ini dilakukan 10 hari setelah pemberian pupuk (5-6-2008).

Berat basah atau Fresh weight (g) sampel tanaman panili yang diambil dari masing-masing perlakuan							
Kontrol		Urea		TSP		KCL	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
29.3	21.8	50.1	26.3	45.6	26.9	50	39.8
Sampel tanaman panili ini dijadikan potongan kecil-kecil sebelum diinkubasi dalam etanol 70% sebanyak 50 ml							
50	50	50	50	50	50	50	50
Inkubasi selama 24 jam (9/6/2008-10/6/2008)							
Digerus dalam mortar, dibilas dengan alkohol 70% sebanyak 25 ml dan diinkubasi kembali selama 24 jam sebelum disaring dengan kapas untuk memisahkan ampas yang kasar.							
Dipanaskan pada pemanasan rendah dengan stove listrik untuk menguapkan alkoholnya. Filtrat yang ditempatkan dalam Becker glass ini diuapkan sampai mencapai volume kurang dari volume equivalent berat sampel. Setelah didinginkan, filtrat ini selanjutnya disentrifuge untuk memisahkan kotoran yang halus.							
Konsentrasi larutan diatur sebesar 1 g FW/ml dengan penambahan aquadest secukupnya. Dengan demikian volume akhir (ml) dari larutan ekstrak adalah seperti terlihat berikut ini:							
Kontrol		Urea		TSP		KCl	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
29.3	21.8	50.1	26.3	45.6	26.9	50	39.8

Tabel 5.4. Kecuali berat masing-masing sampel dan waktu pemanenan stek, langkah-langkah ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili pada pemanenan ketiga (T2) sama dengan T0. Berat sampel tanaman panili pada T2, dari masing-masing perlakuan unsur hara disajikan dalam tabel. Pemanenan sampel T2 ini dilakukan 20 hari setelah pemberian pupuk (15-6-2008).

Berat basah atau Fresh weight (g) sampel tanaman panili yang diambil dari masing-masing perlakuan							
Kontrol		Urea		TSP		KCL	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
52.5	23.4	57.3	35.5	58	39.7	48.7	41.4
Sampel tanaman panili ini dijadikan potongan kecil-kecil sebelum diinkubasi dalam etanol 70% sebanyak 50 ml							
50	50	50	50	50	50	50	50
Inkubasi selama 24 jam (16/6/2008-17/6/2008)							
Digerus dalam mortar, dibilas dengan alkohol 70% sebanyak 25 ml dan diinkubasi kembali selama 24 jam sebelum disaring dengan kapas untuk memisahkan ampas yang kasar.							
Dipanaskan pada pemanasan rendah dengan stove listrik untuk menguapkan alkoholnya. Filtrat yang ditempatkan dalam Becker glass ini diuapkan sampai mencapai volume kurang dari volume equivalent berat sampel. Setelah didinginkan, filtrat ini selanjutnya disentrifuge untuk memisahkan kotoran yang halus.							
Konsentrasi larutan diatur sebesar 1 g FW/ml dengan penambahan aquadest secukupnya. Dengan demikian volume akhir (ml) dari larutan ekstrak adalah seperti terlihat berikut ini:							
Kontrol		Urea		TSP		KCl	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
52.5	23.4	57.3	35.5	58	39.7	48.7	41.4

5.1.2 Hidrolisa dan uji kualitatif kadar sukrosa pada larutan standard dan sampel

5.1.2.1 Hidrolisa dan uji kualitatif larutan standard

Larutan standard dibuat memiliki konsentrasi: 0.00, 0.5, 1, 1.5 dan 2% sukrosa authentic. Setelah dihidrolisa dengan HCl dan direaksikan dengan pereaksi Benedict dalam air mendidih, sesuai prosedur yang ditetapkan dalam metode penelitian, perubahan warna pada larutan standard ini digunakan sebagai pembandingan untuk melakukan estimasi terhadap konsentrasi sukrosa pada sampel. Dalam uji klinik, data kualitatif berupa perbedaan warna endapan biasanya dikonversi menjadi data kualitatif yang berupa angka seperti positif 1, positif 2 dstnya (Gandasoebrata 2007, h. 91). Pedoman konversi tersebut disajikan dalam tabel 5.5.

Tabel 5.5. Konsentrasi larutan sukrosa standard dan warna yang terjadi setelah uji Benedict. Perubahan warna larutan standar ini digunakan sebagai pedoman untuk menentukan perkiraan konsentrasi sukrosa (estimated sucrose concentration) pada sampel tanaman.

Konsentrasi (%)	Warna yang terbentuk setelah direaksikan dengan pereaksi Benedict.	Katagori klinis
<0.5	Biru jernih atau sedikit agak kehijauan	Negatif
0.5-1	Hijau kekuning-kuningan dan keruh	Positif 1 (1+)
1-1.5	Kuning keruh	Positif 2 (2+)
2-3.5	Jingga atau warna lumpur	Positif 3 (3+)

3.5<	Merah keruh	Positif 4. atau 4+
------	-------------	--------------------

Berbeda dengan uji klinik, pada penelitian ini data kualitatif yang berupa perbedaan warna endapan tidak diubah menjadi angka seperti pada uji klinik karena tidak dimaksudkan untuk mengetahui kondisi penyakit, melainkan untuk mengetahui perubahan laju biosintesis sukrosa. Oleh karena itu, data kualitatif intensitas warna endapan diubah menjadi angka perkiraan konsentrasi sukrosa (Estimated sucrose concentration, Est. Suc. Conc. (%)). Dengan membandingkan warna yang terbentuk pada sampel dengan warna larutan standard ini maka konsentrasi sukrosa pada sampel dapat diestimasi. Apabila warna endapan pada larutan ekstrak hampir sama dengan larutan blanko maka konsentrasi sukrosa adalah 0.00%, apabila hampir sama dengan warna endapan pada larutan standard 0.5% maka konsentrasinya adalah $\approx 0.5\%$, apabila warna endapan lebih mendekati warna biru jernih maka konsentrasinya adalah $\ll 0.5\%$, dstnya. Dengan menggunakan metode kualitatif ini maka perkiraan perubahan kadar sukrosa karena pemberian tambahan unsur hara berupa pupuk akan lebih mudah diamati.

5.1.2.2 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak sampel tanaman panili yang dipanen pada hari yang sama dengan hari pemberian pupuk (T0).

Pada pengujian ini, hasil yang ditemukan setelah dilakukan uji Benedict adalah warna larutan ekstrak panili, terutam ekstrak daun, hampir sama dengan warna larutan blanko (Tabel 5.6).

Tabel 5.6. Hidrolisa dan uji kualitatif sampel tanaman panili (Expt. 1) yang dipanen pada T0. Setelah uji Benedict, konsentrasi sukrosa diestimasi dengan membandingkan warna endapan pada sampel dan larutan standard. Est.Suc.Conc; Estimated sucrose concentration

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
HCl (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan									
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Dan volume diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga terjadi pengenceran sebanyak 50%								
Identifikasi glukosa, hasil hidrolisa sukrosa, dengan uji Benedict									
Bahan uji Ekstrak panili 0.5 g FW/ml (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pereaksi	15	15	15	15	15	15	15	15	15

Benedict (tetes)									
Didihkan diatas penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan secara perlahan									
HASIL									
WARNA	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan
Est.suc.conc	0.00	<<0.5	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5
No. Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Oleh karena itu, konsentrasi sukrosa yang dinyatakan dalam Est. Suc. Conc. Pada ekstrak ini adalah 0.00%. Ekstrak internode tanaman panili menunjukkan warna hijau kekuningan, tetapi apabila dibandingkan dengan larutan standard 0.5% warna tersebut lebih mendekati larutan blanko. Oleh karena itu konsentrasi sukrosa dinyatakan jauh lebih rendah dari 0.5% (<<0.5%). Akan tetapi, kadar sukrosa yang ditemukan pada ekstrak internode ini tidak memperlihatkan perbedaan yang jelas antara tumbuhan kontrol dan tumbuhan yang diberi pupuk. Pengujian pada T0 eksp. 1 ini dengan demikian tidak dapat digunakan untuk melakukan estimasi tentang tambahan unsur hara yang masih diperlukan tanaman panili.

5.1.2.3 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak sampel tanaman panili yang dipanen 10 hari setelah pemberian pupuk (T1).

Hasil pengujian sampel yang dipanen pada T1 hampir sama dengan hasil uji T0 (Tabel 5.7) yaitu warna larutan ekstrak daun hampir sama dengan larutan blanko sehingga konsentrasi sukrosa pada ekstrak daun ini dinyatakan sebesar 0.00%. Sementara itu, kadar sukrosa pada ekstrak internode lebih tinggi dari ekstrak daun tetapi jauh lebih rendah dari konsentrasi sukrosa standard 0.5%. Oleh karena itu kadar sukrosa internode ini dinyatakan sebesar <<0.5%. Sama seperti hasil uji sampel T0, sukrosa yang ditemukan pada internode tidak menunjukkan perbedaan yang jelas antara tanaman kontrol dan tanaman yang diberi tambahan unsur hara. Oleh karena itu, diagnosa terhadap tambahan unsur hara yang diperlukan tumbuhan panili juga tidak diketahui melalui uji sampel pada T1, eksperimen ini.

Tabel 5.7. Hidrolisa dan uji kualitatif sampel tanaman panili (Expt. 1) yang dipanen pada T1. Setelah uji Benedict, konsentrasi sukrosa diestimasi dengan membandingkan warna endapan pada sampel dan larutan standard. Est.Suc.Conc; Estimated sucrose concentration

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
HCl (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan									
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Dan volume diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga terjadi pengenceran sebanyak 50%								
Identifikasi glukosa, hasil hidrolisa sukrosa, dengan uji Benedict									
Bahan uji Ekstrak panili 0.5 g FW/ml (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pereaksi Benedict (tetes)	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Didihkan diatas penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan secara perlahan									
HASIL									
WARNA	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan
Est.conc.	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	0.00	0.00	<<0.5
No. Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9

5.1.2.4 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak sampel tanaman panili yang dipanen 20 hari setelah pemberian pupuk (T2).

Berbeda dengan hasil uji sampel pada T0 dan T1, kadar sukrosa yang ditemukan pada T2 jauh lebih tinggi. Sukrosa yang ditemukan pada internode hampir mendekati konsentrasi larutan standard 0.5% (Tabel 5.8). Namun demikian, kadar sukrosa yang tinggi ini ditemukan baik pada kontrol maupun pada sampel tanaman yang diberi pupuk. Pemberian pupuk dengan dosis standard: Urea 9.25 g, TSP 1.1 g dan KCl 4.6 g/pohon tidak ditemukan dapat mempengaruhi biosintesis sukrosa pada tanaman panili tersebut.

Perbedaan konsentrasi sukrosa antara sampel T0, T1 dan T2 pada eksperimen 1 ini kemungkinan diakibatkan oleh penanganan sampel sebelum dianalisa karena sukrosa yang disimpan dalam internode stek panili dapat dengan cepat digunakan untuk memperoleh energi atau diubah menjadi senyawa yang inert secara osmosis. Kemungkinan ini sesuai dengan pendapat Albert et al. 1983 bahwa sukrosa yang ditranslokasikan dalam tumbuhan harus segera diubah menjadi senyawa yang inert secara osmosis agar translokasi dapat berjalan secara kontinyu. Untuk mengatasi kemungkinan pengubahan sukrosa sebelum diekstrak, maka teknik pengambilan sampel harus diperbaiki yaitu dengan cara melakukan “dissecting” dan pencelupan sampel kedalam etanol 70% segera

setelah pemanenan. Dengan cara ini maka kemungkinan sukrosa digunakan dalam metabolisme menjadi lebih kecil.

Tabel 5.8. Hidrolisa dan uji kualitatif sampel tanaman panili (Expt. 1) yang dipanen pada T2. Setelah uji Benedict, konsentrasi sukrosa diestimasi dengan membandingkan warna endapan pada sampel dan larutan standard. Est.Suc.Conc; Estimated sucrose concentration

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
HCl (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan									
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Dan volume diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga terjadi pengenceran sebanyak 50%								
Identifikasi glukosa, hasil hidrolisa sukrosa, dengan uji Benedict									
Ekstrak panili 0.5 g FW/ml (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pereaksi Benedict (tetes)	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Dididihkan diatas penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan secara perlahan									
HASIL									
WARNA	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	Kuning keruh
Est. Suc. Conc	0.00	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	≈0.5	0.5<
No. Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Walau demikian, secara umum dapat dikemukakan bahwa hasil uji kualitatif pada T2 ini konsisten dengan temuan sebelumnya (Penelitian tahun I) bahwa tanaman panili menyimpan sebagian besar hasil fotosintesis sukrosa pada internode, bukan pada daun. Akan tetapi, karena pupuk yang diberikan tidak menunjukkan respon biosintesis yang berbeda antara kontrol dan perlakuan dengan N, P dan K maka pada experiment 1 (tahun II) ini tidak dilakukan pemanenan stek untuk transplantasi. Hal ini disebabkan oleh karena perbedaan kadar sukrosa tersebut digunakan sebagai variable independent untuk pertumbuhan kuncup ketiak pada steks yang ditransplantasi.

5.2 Hasil penelitian experiment 2.

5.2.1 Pengambilan sampel dan ekstraksi sukrosa

Pengambilan sampel pada eksperimen 2 ini pada dasarnya sama dengan eksperimen 1 yaitu dilakukan pemanenan sebanyak 3 x, T0, T1 dan T2. Akan tetapi karena eksperimen 1 (T2) tidak dapat membedakan antara konsentrasi sukrosa pada kelompok kontrol dan kelompok tumbuhan yang diberi pupuk, maka teknik pengambilan sampel dan pemberian pupuk dimodifikasi.

Untuk T0 pada eksperimen 2 ini, sampel tanaman panili dipanen pada sore hari (sekitar jam 3) setelah semua pohon panili yang digunakan sebagai subjek penelitian diberi pupuk. Masing-masing sampel dari tumbuhan yang diberi Urea, TSP dan KCl serta kontrol dimasukkan dalam kantong plastic transparan (1kg) sebelum dimasukkan dalam kantong plastic yang lebih besar dan tidak transparan. Sampel ini kemudian di "dissect" dan diinkubasi pada pagi hari keesokan harinya dengan alkohol 70% sebanyak 100 ml. Jadi sebelum di "dissect", sampel berada sebagian besar dalam kondisi tanpa sinar. Oleh karena itu, sukrosa yang mungkin masih terdapat dalam sampel itu merupakan simpanan hasil fotosintesis yang belum digunakan dalam metabolisme selama periode 12 jam sebelum diseksi.

Pada eksperimen 2 ini, pemberian pupuk juga dilakukan dalam bentuk larutan seperti pada eksperimen 1. Pupuk Urea, TSP dan KCl dimasukkan dalam botol aqua kemudian ditambah air sebelum dikocok sampai pupuk tersebut tercampur merata. Larutan ini kemudian dituangkan ke pangkal pohon yang digunakan sebagai stump dimana akar panili sebagian besar melekat sebelum menyebar ke daerah yang lebih luas disekitarnya.

Untuk menaikkan kadar sukrosa pada kelompok perlakuan maka dosis pupuk/pohon dinaikkan sebanyak 2X sehingga Urea, TSP dan KCl masing-masing diberikan sebanyak 18.5, 2.2 dan 9.2 g/pohon. Pemberian jumlah ini dimaksudkan untuk mengetahui effect diagnostik terhadap tambahan unsur hara yang diberikan pada tumbuhan. Jika jumlah tersebut mengakibatkan terjadinya penurunan biosintesis sukrosa, maka lahan tempat tumbuhnya panili tersebut tidak memerlukan tambahan unsur hara yang berupa pupuk. Akan tetapi sebaliknya apabila biosintesis sukrosa naik setelah kenaikan dosis pupuk tersebut maka berarti tumbuhan masih memerlukan tambahan unsur hara yang berupa pupuk.

Tabel.5. 9. Pemberian pupuk pada eksperimen 2 dengan dosis: Urea, 18.5 g/pohon; TSP, 2.2 g/pohon dan KCl, 9.2 g/pohon. Ukuran dosis ini adalah 2x dosis standar. Pemupukan diberikan pada tgl, 4 Juli 2008.

Pohon induk panili	Unsur hara tambahan yang diuji		Waktu pemanenan sampel setelah pemberian pupuk
	Jenis pupuk	Dosis (g/pohon)	
1	Urea	18.5	24 Hari (T2)
2	TSP	2.2	11 Hari (T1)
3	Urea	18.5	Hari H (T0)
4	KCl	9.2	Hari H (T0)
5	Urea	18.5	
6	TSP	2.2	Hari H (T0)
7	Urea	18.5	11 hari (T1)
8	KCl	9.2	Hari H (T0)
9	KCl	9.2	11 hari (T1)
10	TSP	2.2	
11	TSP	2.2	24 hari (T2)
12	KCl	9.2	24 hari (T2)

Untuk tujuan ini maka jumlah pohon panili yang diberi pupuk sama seperti pada experiment 1 yaitu 12 pohon yang dikelompokkan masing-masing 4 pohon untuk Urea, TSP dan KCl. Pemberian jenis pupuk pada pohon panili ini dilakukan secara random (Tab. 5.9) semata-mata dimaksudkan untuk memenuhi asumsi bahwa persediaan unsur hara pada lahan tersebut adalah sama. Pengambilan sampel dan ekstraksi sukrosa untuk eksperimen 2 ini disajikan dalam tabel 5.10, 5.11 dan 5.12 masing-masing untuk T0, T1 dan T2.

5.2.2 Hidrolisa dan uji kualitatif kadar sukrosa experiment 2.

5.2.2.1 Hidrolisa dan uji kualitatif larutan standard

Larutan standard yang dibuat memiliki konsentrasi yang sama dengan konsentrasi yang dibuat untuk eksperimen 1 yaitu: 0.00, 0.5, 1, 1.5 dan 2% sukrosa authentic. Metode hidrolisa dan uji kualitatif serta pemakaiannya juga sama dengan eksperimen 1. Perlu ditambahkan bahwa pengujian larutan standard ini selalu dilakukan bersamaan dengan pengujian kadar sukrosa pada panili dari masing-masing pemanenan, T0, T1, T2 dari kedua eksperimen. Dengan demikian maka warna endapan yang terjadi pada larutan standard dan sampel dihasilkan pada kondisi experiment yang sama.

Tabel 5.10. Langkah-langkah ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili pada pemanenan pertama (T0) pada expt. 2. Setelah dipisahkan menjadi daun dan batang, masing-masing sampel tanaman ditimbang dan dijadikan potongan kecil-kecil. Sampel ini

kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam etanol 70% sebanyak 100 ml sebelum digerus dalam mortar. Sampel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam untuk selanjutnya disaring dan diuapkan untuk memisahkan alkoholnya. Volume ekstraks kemudian diatur dengan penambahan air untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak 1 g FW/ml. Pemanenan sampel T0 ini dilakukan pada hari yang sama dengan hari pemberian pupuk (4 Juli 2008).

Berat basah atau Fresh weight (g) sampel tanaman panili yang diambil dari masing-masing perlakuan							
Kontrol		Urea		TSP		KCL	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
50	40	36.7	36.5	50	37.7	60	27.7
Sampel tanaman panili ini dijadikan potongan kecil-kecil sebelum diinkubasi dalam etanol 70% sebanyak 50 ml							
100	100	100	100	100	100	100	100
Inkubasi selama 48 jam (5/6/2008 sd 7/6/2008)							
Digerus dalam mortar, dibilas dengan alkohol 70% sebanyak 25 ml dan disaring dengan kapas untuk memisahkan ampas yang kasar.							
Dipanaskan pada pemanasan rendah dengan hot plates untuk menguapkan alkoholnya. Filtrat yang ditempatkan dalam Becker glass ini diuapkan sampai mencapai volume kurang dari volume equivalent berat sampel.							
Volume akhir kemudian diatur dengan penambahan aquadest secukupnya. Dengan mengetahui volume akhir maka konsentrasi larutan dapat diketahui. Setelah penambahan aquadest, ekstrak kemudian disaring kembali dengan kapas agar kotoran kasar yang masih tertinggal dapat dipisahkan dari ekstrak.							
Volume akhir (ml) dan konsentrasi fresh weight pada masing-masing ekstrak (g/ml)							
Kontrol		Urea		TSP		KCl	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
50	40	50	40	50	50	60	27.7
1g Fw/ml	1 g FW/ml	0.732 g FW /ml	0.9125 g FW/ml	1 g FW/ml	0.754 g FW/ml	1 g FW/ml	1 g FW/ml

Tabel 5.11. Kecuali berat masing-masing sampel dan waktu pemanenan stek, langkah-langkah ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili pada pemanenan kedua (T1) sama dengan T0. Berat sampel tanaman panili pada T1, dari masing-masing perlakuan unsur hara disajikan dalam tabel. Pemanenan sampel T1 ini dilakukan 11 hari setelah pemberian pupuk (15 Juli 2008).

Berat basah atau Fresh weight (g) sampel tanaman panili yang diambil dari masing-masing perlakuan											
Kontrol			Urea			TSP			KCl		
Daun	Batang	Akar	Daun	Batang	Akar	Daun	Batang	Akar	Daun	Batang	Akar
32.2	33.8	2.5	35.4	35.2	1.4	32.2	38.7	2.5	65.7	38.6	1.8
Sampel tanaman panili ini dijadikan potongan kecil-kecil sebelum diinkubasi dalam etanol 70% sebanyak 100 ml untuk daun dan batang dan 25 ml untuk sampel akar											
100	100	25	100	100	25	100	100	25	100	100	25
Inkubasi selama 48 jam (16/7/2008 sd 18/7/2008)											
Digerus dalam mortar, dibilas dengan alkohol 70% sebanyak 25 ml dan disaring dengan kapas untuk memisahkan ampas yang kasar.											
Dipanaskan pada pemanasan rendah dengan hot plates untuk menguapkan alkoholnya. Filtrat yang ditempatkan dalam Becker glass ini diuapkan sampai mencapai volume kurang dari volume equivalent berat sampel.											
Volume akhir kemudian diatur dengan penambahan aquadest secukupnya. Dengan mengetahui volume akhir maka konsentrasi larutan dapat diketahui. Setelah penambahan aquadest, ekstrak kemudian disaring kembali dengan kapas agar kotoran kasar yang masih tertinggal dapat dipisahkan dari ekstrak.											
Volume akhir (ml) dan konsentrasi fresh weight pada masing-masing ekstrak (g/ml)											
32.2	33.8	-	35.4	35.2	-	32.2	38.7	-	65.7	38.6	-
1g/ml	1g/ml	-	1g/ml	1g/ml	-	1g/ml	1g/ml	-	1g/ml	1g/ml	-

Tabel 5.12. Kecuali berat masing-masing sampel dan waktu pemanenan stek, langkah-langkah ekstraksi sukrosa dari sampel tanaman panili pada pemanenan ketiga (T2) sama dengan T0. Berat sampel tanaman panili pada T2, dari masing-masing perlakuan unsur hara disajikan dalam tabel. Pemanenan sampel T2 ini dilakukan 24 hari setelah pemberian pupuk (28 Juli 2008).

Berat basah atau Fresh weight (g) sampel tanaman panili yang diambil dari masing-masing perlakuan							
Kontrol		Urea		TSP		KCL	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
75.2	49.4	74.1	49.1	57.2	50.8	54.7	51.7
Sampel tanaman panili ini dijadikan potongan kecil-kecil sebelum diinkubasi dalam etanol 70% sebanyak 100ml							
100	100	100	100	100	100	100	100
Inkubasi selama 24 jam (29-31 Juli 2009)							
Digerus dalam mortar, dibilas dengan alkohol 70% sebanyak 25 ml dan diinkubasi kembali selama 24 jam sebelum disaring dengan kapas untuk memisahkan ampas yang kasar.							
Dipanaskan pada pemanasan rendah dengan stove listrik untuk menguapkan alkoholnya. Filtrat yang ditempatkan dalam Becker glass ini diuapkan sampai mencapai volume kurang dari volume equivalent berat sampel. Setelah didinginkan, filtrat ini selanjutnya disentrifuge untuk memisahkan kotoran yang halus.							
Konsentrasi larutan diatur sebesar 1 g FW/ml dengan penambahan aquadest secukupnya. Dengan demikian volume akhir (ml) dari larutan ekstrak adalah seperti terlihat berikut ini:							
Kontrol		Urea		TSP		KCl	
Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
75.2	49.4	74.1	49.1	57.2	50.8	54.7	51.7

5.2.2.2 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak sampel tanaman panili (Expt. 2).

Sampel ini dipanen pada hari yang sama dengan hari pemberian pupuk (T0). Pemanenan ini dilakukan pada tanggal 4 Juli 2008, sampel diuji dengan pereaksi Benedict pada tanggal 11 Juli 2008.

Pengujian kadar sukrosa kualitatif dengan uji Benedict pada T0 expt 2 ini menunjukkan hasil yang hampir sama dengan hasil yang ditemukan pada pengujian sampel T2 experiment 1 yaitu semua ekstrak batang tanaman menunjukkan nilai positif 1+ dan semua ekstrak daun menunjukkan nilai (-). Akan tetapi, pada tanaman yang diberi TSP, kadar sukrosa yang ditemukan pada ekstrak batang T0 ini justru negative, sedangkan ekstrak tanaman yang diberi Urea justru menunjukkan konsentrasi yang sangat tinggi hampir mendekati konsentrasi sukrosa authentic 0.5% (Tabel 5.13). Hal ini berbeda dengan kadar sukrosa yang ditemukan pada experiment 1. Variasi kadar sukrosa kualitatif yang dideteksi pada eksperimen 2 ini memunculkan beberapa kemungkinan tentang pengaruh pemberian pupuk pada perubahan biosintesis sukrosa. Pada eksperimen 1, pengaruh pemberian pupuk dengan dosis standard tidak dapat membedakan antara kontrol dan tanaman yang diberi pupuk, tetapi setelah dosis pupuk dinaikkan menjadi 2x dosis standard, ditemukan bahwa kadar gula pada tanaman yang diberi TSP dan KCl hampir sama dengan kadar sukrosa pada kontrol tetapi kadar gula pada tanaman yang diberi Urea hampir sama dengan kadar larutan authentic sukrosa 0.5%.

Tabel 5.13. Hidrolisa dan uji kualitatif sampel tanaman panili yang dipanen pada T0. Setelah uji Benedict, warna yang terjadi dibandingkan dengan warna larutan standard. Est. Suc. Conc, Estimated sucrose concentration.

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)	
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml

	5	Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
HCl (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan									
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Dan volume diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga terjadi pengenceran sebanyak 50%								
Identifikasi glukosa, hasil hidrolisa sukrosa, dengan uji Benedict									
Bahan uji Ekstrak panili 0.5 g FW/ml (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pereaksi Benedict (tetes)	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Didihkan diatas penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan secara perlahan									
HASIL									
WARNA	Biru jernih	Sedikit agak kehijauan	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Sedikit agak kehijauan	Biru jernih	Hijau kekuningan
Est. Suc. Conc.(%)	0.00	<0.5	<0.5	0.00	≈0.5	0.00	<<0.5	0.00	<0.5
No. Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Pertanyaan yang cukup menarik kemudian muncul dari temuan ini a.l. apakah pemberian pupuk Urea sebanyak 18.2 g/pohon tersebut dapat menaikkan biosintesis sukrosa hanya beberapa jam setelah pupuk tersebut diberikan atau sebaliknya apakah peningkatan dosis TSP dan KCl tidak meningkatkan biosintesis secepat yang terjadi pada tanaman yang diberi Urea. Pertanyaan ini tentu hanya bisa dijawab setelah dilakukan pengujian pada T1 atau T2. Akan tetapi apabila hasil tersebut disebabkan hanya oleh faktor pemberian Urea, maka secara diagnostik dapat dibuat kesimpulan sementara bahwa tumbuhan panili yang dibudidayakan pada lahan di daerah penyangga hutan tersebut masih memerlukan tambahan unsur hara nitrogen. Hal inipun kemudian memerlukan penelitian lanjutan mengingat bahwa tanaman panili ditumbuhkan dengan leguminosae sebagai stum yang memiliki kemampuan untuk mengikat N dari udara bekerja sama dengan bakteri N.

5.2.2.3 Hidrolisa dan uji kualitatif ekstrak sampel tanaman panili (Expt. 2). Sampel ini dipanen 11 hari setelah pemberian pupuk (T1).

Pada kondisi penelitian yang dilakukan, kadar sukrosa pada ekstrak tanaman panili yang dipanen 11 hari setelah pemberian pupuk (T1) konsisten dengan data T0 (Tabel

5.14). Kadar sukrosa yang ditemukan pada internode tumbuhan yang diberi Urea adalah hampir sama dengan konsentrasi larutan standard 0.5%. Konsentrasi ini sangat tinggi dibandingkan dengan konsentrasi sukrosa yang ditemukan pada tanaman yang diberi pupuk TSP maupun KCl. Kadar sukrosa pada tumbuhan yang diberi Urea ini juga lebih tinggi dari tanaman kontrol, yang konsentrasinya hampir sama dengan tumbuhan yang diberi TSP atau KCl. Walau lebih rendah dari internode, sukrosa juga ditemukan pada ekstrak daun dari tanaman yang diberi Urea. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian tambahan unsur hara nitrogen tersebut dapat meningkatkan biosintesis sukrosa pada tingkat yang cukup tinggi untuk ditranslokasikan ke internode. Pada tingkat ini, laju biosintesis melebihi laju pemakaian sukrosa untuk metabolisme atau laju perubahan menjadi senyawa yang inert secara osmosis. Situasi ini berbeda dengan tanaman yang diberi TSP dimana sukrosa yang terdapat pada internode lebih rendah dan pada daun konsentrasi hampir mendekati larutan blanko.

Tabel 5.14. Hidrolisa dan uji kualitatif sampel tanaman panili yang dipanen pada T1. Setelah uji Benedict, warna yang terjadi dibandingkan dengan warna larutan standard. Est. Suc. Conc, Estimated sucrose concentration.

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
HCl (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan									
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Dan volume diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga terjadi pengenceran sebanyak 50%								
Identifikasi glukosa, hasil hidrolisa sukrosa, dengan uji Benedict									
Bahan uji Ekstrak panili 0.5 g FW/ml (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pereaksi Benedict (tetes)	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Didihkan diatas penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan secara perlahan									
HASIL									
WARNA	Biru jernih	biru	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	Endapan merah bata	biru	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan
Est. Suc. Conc.(%)	0.00	0.00	<0.5	<0.5	≈0.5	0.00	<0.5	<0.5	<0.5
No. Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9

5.2.2.4 Ekstrak sampel tanaman panili (Expt. 2) yang dipanen 24 hari setelah pemberian pupuk (T2).

Pada pemanenan sampel 24 hari setelah pemberian pupuk, ekstrak tanaman panili yang diberi TSP dan KCl justru menunjukkan konsentrasi yang sangat tinggi yaitu hampir mendekati konsentrasi larutan sukrosa standard 0.5% (Tabel 5.15). Konsentrasi yang ditemukan ini berbeda dengan T0 dan T1 yang menunjukkan kadar sukrosa tinggi pada tanaman yang diberi Urea. Dengan demikian maka respon tumbuhan terhadap pemberian TSP dan KCl lebih lambat dari pada pemberian unsur hara Urea.

Tabel 5.15. Hidrolisa dan uji kualitatif sampel tanaman panili yang dipanen pada T2. Setelah uji Benedict, warna yang terjadi dibandingkan dengan warna larutan standard. Est. Suc. Conc, Estimated sucrose concentration.

Pereaksi	Bahan yang diuji (ml)								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
HCl (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Panaskan dalam air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan perlahan									
NaOH 2%	Tambahkan secukupnya pada masing-masing tabung (sekitar 5ml) untuk menetralkan asam. Kenetralan diuji dengan kertas lakmus. Dan volume diatur menjadi 10 ml dengan aquadest sehingga terjadi pengenceran sebanyak 50%								
Identifikasi glukosa, hasil hidrolisa sukrosa, dengan uji Benedict									
Bahan uji Ekstrak panili 0.5 g FW/ml (tetes)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pereaksi Benedict (tetes)	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Didihkan diatas penangas air selama 5 menit kemudian didinginkan secara perlahan									
HASIL									
WARNA	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Sedikit Agak kehijauan	Sedikit Agak kehijauan	Endapan Merah bata	Biru jernih	Endapan Merah bata
Est. Conc.	0.00	0.00	<0.5	0.00	<<0.5	<<0.5	≈0.5	0.00	≈0.5
No. Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9

5.3 Pengukuran kadar sukrosa secara kuantitatif pada ekstrak tanaman panili

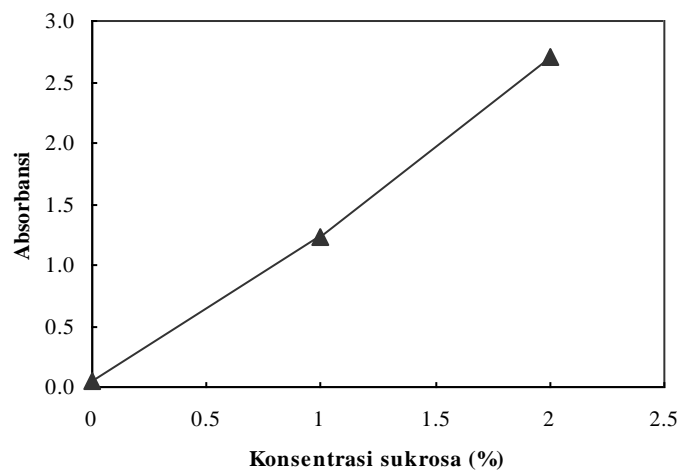
5.3.1. Studi pendahuluan

Pengujian sukrosa secara kuantitatif ini menggunakan metode Nelson-Somogyi seperti yang diuraikan oleh Estien Yazid dan Lisda Nursanti (2006). Sebelum dilakukan pengujian terhadap sampel tanaman panili yang digunakan sebagai penelitian, maka terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan (preliminary study) untuk mengetahui konsistensi data pengukuran. Preliminary studi ini adalah pengujian 3 jenis larutan yaitu larutan blanko, larutan sukrosa 1% dan 2% yang telah dihidrolisa. Pengujian ini menggunakan Apel PD-303S Spectrophotometer. Langkah-langkah yang dilakukan untuk uji pendahuluan ini diperlihatkan pada tabel 5.16.

Tabel 5.16. Langkah-langkah pengujian glukosa terhidrolisa pada studi pendahuluan

No Tabung	1	2	3
Bahan uji	blanko	Sukrosa 1%	Sukrosa 2%
Pereaksi	Nelson A, B (1 ml)	Nelson A, B (1 ml)	Nelson A, B (1 ml)
Dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit dan selanjutnya didinginkan dengan air dingin dalam Becker glass.			
Pereaksi	Arsenomolibdat (1ml)	Arsenomolibdat (1ml)	Arsenomolibdat (1ml)
Vortex sampai endapan larut semua			
Aquadest	7ml	7 ml	7 ml
Vortex sampai homogen			
Baca absorbansi pada panjang gelombang 540 nm			
ABS	0.056	1.229	2.699

Absorbansi yang didapat dari pengukuran ini adalah sangat proporsional dengan konsentrasi yang diukur. Jika hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan kemudian digambarkan dalam bentuk grafik, maka akan terlihat sbb:



Gambar 5.1. Kurve standard Uji Pendahuluan.
Pereaksi Nelson A dan B dicampur sama banyak,
konsentrasi gula terhidrolisa 1000 dan 2000 mg/100 ml

Grafik ini menunjukkan hubungan positif dan proportional yaitu pada kenaikan konsentrasi 2 x lipat, absorbansi juga naik 2x lipat. Oleh karena itu, metode ini cukup valid untuk digunakan sebagai alat ukur. Untuk dapat mengukur kadar sukrosa pada sampel secara lebih akurat maka dibuat standard dengan konsentrasi yang lebih rinci.

5.3.2 Pembuatan “glukosa terhidrolisa standard” (1)

Sukrosa dengan konsentrasi 1% yang dihidrolisa dengan prosedur seperti disajikan pada tabel 4.3, hal. 29, akan menjadi “glukosa terhidrolisa”. Glukosa terhidrolisa ini memiliki konsentrasi setara dengan 0.5% sukrosa karena pada proses hidrolisa terjadi penambahan NaOH 2% sekitar 5 ml terhadap 5 ml sukrosa 1%. Pada proses ini volume akhir kemudian dibuat menjadi 10 ml dengan penambahan aquadest.

Untuk membuat “glukosa terhidrolisa standard” maka larutan 0.5% tersebut diencerkan menjadi 0.002, 0.004, 0.005, 0.006, 0.008 dan 0.010%. Kadar ini setara dengan 2.00; 4.00; 5.00; 6.00; 8.00 dan 10 mg/100ml. Untuk membuat larutan dengan konsentrasi tersebut maka dilakukan pengenceran dengan perhitungan sbb:

$$1. \quad 0.5\% \times ml \rightarrow 0.002\% \ 20 \text{ ml}$$

$$x = \frac{0.002}{0.5} \times 20 \text{ ml} = \frac{4}{100} \times \frac{5}{10} \text{ ml} = \frac{20}{1000} \text{ ml} = 20 \mu\text{l}$$

$$2. \quad 0.5\% \times ml \rightarrow 0.004\% \ 20 \text{ ml}$$

$$x = \frac{0.004}{0.5} \times 20 \text{ ml} = \frac{8}{100} \times \frac{5}{10} \text{ ml} = \frac{40}{1000} \text{ ml} = 40 \mu\text{l}$$

$$3. \quad 0.5\% \times ml \rightarrow 0.005\% \ 20 \text{ ml}$$

$$x = \frac{0.005}{0.5} \times 20 \text{ ml} = \frac{1}{10} \times \frac{5}{10} \text{ ml} = \frac{5}{100} \text{ ml} = 50 \mu\text{l}$$

$$4. \quad 0.5\% \times ml \rightarrow 0.006\% \ 20 \text{ ml}$$

$$x = \frac{0.006}{0.5} \times 20 \text{ ml} = \frac{12}{100} \times \frac{5}{10} \text{ ml} = \frac{60}{1000} \text{ ml} = 60 \mu\text{l}$$

$$5. \quad 0.5\% \times ml \rightarrow 0.008\% \ 20 \text{ ml}$$

$$x = \frac{0.008}{0.5} \times 20 \text{ ml} = \frac{16}{100} \times \frac{5}{10} \text{ ml} = \frac{80}{1000} \text{ ml} = 80 \mu\text{l}$$

$$6. \quad 0.5\% \times ml \rightarrow 0.010\% \ 20 \text{ ml}$$

$$x = \frac{0.010}{0.5} \times 20 \text{ ml} = \frac{2}{10} \times \frac{5}{10} \text{ ml} = \frac{10}{100} \text{ ml} = 100 \mu\text{l}$$

Setelah disediakan larutan standard tersebut, maka dilakukan pembuatan kurva standard menurut langkah-langkah sbb:

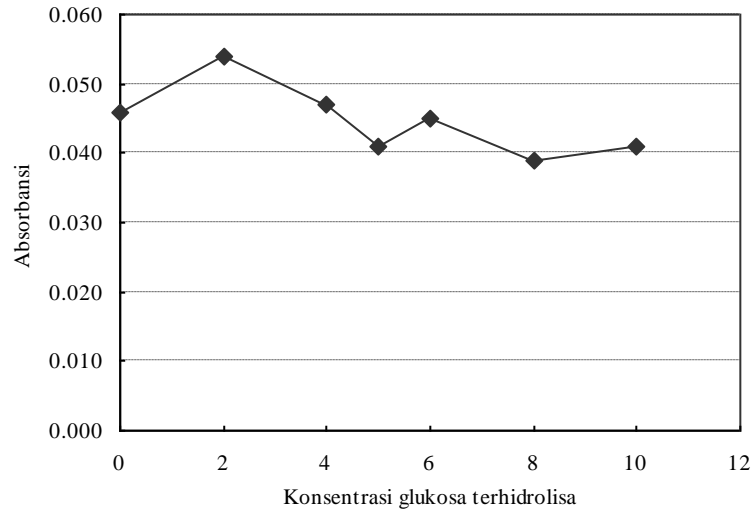
1. Siapkan “glukosa terhidrolisa standard” dengan konsentrasi 0.5 g/100 ml.
2. Lakukan 6 kali pengenceran seperti perhitungan diatas sehingga didapat “glukosa terhidrolisa” dengan konsentrasi 2.0;4.0;5.0;6.0;8.0 dan 10mg/100ml.
3. Siapkan 7 tabung reaksi yang bersih dan kering kemudian isilah masing-masing dari keenam tabung dengan 1 ml larutan “glukosa terhidrolisa” tersebut dan 1 ml “aquadest terhidrolisa”.
4. Kedalam setiap tabung diatas, tambahkan 1 ml pereaksi Nelson (campuran sama banyak antara pereaksi Nelson A dan B). Tabung kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit.
5. Ambil semua tabung dan segera dinginkan dengan memasukkannya kedalam gelas kimia yang berisi air dingin.
6. Setelah dingin, temperatur mencapai sekitar 25°C yang diukur dengan termometer, tambahkan kedalam setiap tabung 1 ml pereaksi Arsenomolibdat. Vortex sampai semua endapan larut.
7. Tambahkan 7 ml aquadest. Vortex sampai homogen.
8. Baca serapan (absorbansi pada $\lambda 540$ nm) pada spektrofotometer.
9. Buat kurve standard.

Tabel 5.17 Data absorbansi dari larutan standard 1

No. Tabung	Konsentrasi larutan standard (mg/100 ml)	Absorbansi pada $\lambda 540$ nm
1	0.00	0.046
2	2	0.054
3	4	0.047
4	5	0.041
5	6	0.045
6	8	0.039
7	10	0.041

Data absorbansi yang didapat tidak dapat membedakan konsentrasi larutan standard pada rentangan 0-10 mg/100ml. Sebagai mana terlihat dalam grafik berikut ini, kenaikan

konsentrasi larutan tidak mengakibatkan kenaikan absorbansi. Dengan demikian grafik yang dibuat dengan konsentrasi larutan pada rentangan 0-10 mg/100ml tidak dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi larutan sampel.



Gambar 5.2. Kurve standard 1. Pereaksi Nelson A dan B dicampur sama banyak, konsentrasi gula terhidrolisa: 0 sd 10 mg/100 ml

5.3.3. Pembuatan "glukosa terhidrolisa" standard 2.

Oleh karena rentangan konsentrasi 0-10 mg/100 ml tidak dapat menunjukkan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi, maka dibuat larutan standard 2. Rentangan konsentrasi larutan standard ini dibuat antara 0 – 500 mg/100ml. Hal ini disesuaikan dengan data uji kualitatif yang mengindikasikan bahwa konsentrasi sukrosa maksimum pada ekstraks adalah 0.5% atau 500 mg/100 ml.

Prosedur yang digunakan adalah sama dengan prosedur pembuatan standard diatas kecuali bahwa konsentrasinya dinaikkan menjadi seperti pada tabel dibawah ini:

Tabel 5.18. Konsentrasi larutan glukosa terhidrolisa untuk standard 2

No. Tabung	Konsentrasi larutan standard (mg/100 ml)	Absorbansi pada $\lambda 540$ nm
1	0.00	
2	50	
3	100	
4	150	
5	200	
6	250	
7	500	

Perhitungan yang dilakukan untuk membuat konsentrasi sesuai rentangan tersebut adalah sama dengan standard 1 kecuali larutan stok yang digunakan memiliki konsentrasi 1% (= 1000 mg/100 ml).

1. Pembuatan larutan 50 mg/100 ml (= 0.05%)
1% x ml → 0.05% 20 ml

$$x = \frac{0.05}{1} \times 20ml = 1ml$$

1 ml larutan sukrosa 1% ditambah aquadest sampai 20 ml didapat larutan dengan konsentrasi 50 mg/100 ml

2. Pembuatan larutan 100 mg/100 ml (=0.1%)

1% x ml → 0.1% 20 ml

$$x = \frac{0.1}{1} \times 20ml = 2ml$$

2 ml larutan sukrosa 1% ditambah aquadest sampai 20 ml didapat larutan dengan konsentrasi 100 mg/100 ml

3. Pembuatan larutan 150 mg/100 ml (=0.15%)
1% x ml → 0.15% 20 ml

$$x = \frac{0.15}{1} \times 20ml = 3ml$$

3 ml larutan sukrosa 1% ditambah aquadest sampai 20 ml didapat larutan dengan konsentrasi 150 mg/100 ml

4. Pembuatan larutan 200 mg/100 ml (=0.2%)
1% x ml → 0.2% 20 ml

$$x = \frac{0.2}{1} \times 20ml = 4ml$$

4 ml larutan sukrosa 1% ditambah aquadest sampai 20 ml didapat larutan dengan konsentrasi 200 mg/100 ml

5. Pembuatan larutan 250 mg/100 ml (=0.25%)
1% x ml → 0.25% 20 ml

$$x = \frac{0.25}{1} \times 20ml = 5ml$$

5 ml larutan sukrosa 1% ditambah aquadest sampai 20 ml didapat larutan dengan konsentrasi 250 mg/100 ml

6. Pembuatan larutan 500 mg/100 ml (=0.5%)
1% x ml → 0.5% 20 ml

$$x = \frac{0.5}{1} \times 20ml = 10ml$$

10 ml larutan sukrosa 1% ditambah aquadest sampai 20 ml didapat larutan dengan konsentrasi 500 mg/100 ml

Dari perhitungan tersebut diketahui bahwa untuk membuat 6 buah larutan dengan konsentrasi 50-500 mg/100 ml diperlukan larutan 1% "glukosa terhidrolisa" sebanyak 25 ml. Untuk itu dilakukan hidrolisa larutan sukrosa 2% sebanyak 20 ml dengan cara penambahan HCl sebanyak 20 tetes dan dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit. Setelah didinginkan, larutan selanjutnya dinetralkan dengan NaOH 2% dan diuji dengan kertas lakmus. Volume akhir larutan dibuat menjadi 40 ml sehingga didapat larutan 1% "glukosa terhidrolisa".

Langkah-langkah pembuatan kurve standard (2) sama dengan pembuatan kurve standard 1 diatas, kecuali larutan standardnya memiliki konsentrasi yang lebih tinggi.

Langkah-langkah pembuatan standard 2 tersebut adalah sbb:

1. Siapkan “glukosa terhidrolisa standard” dengan konsentrasi 1 g/100 ml (=1%).
2. Lakukan 6 kali pengenceran seperti perhitungan diatas sehingga didapat “glukosa terhidrolisa” dengan konsentrasi 50.0; 100.0; 150.0; 200.0; 250.0 dan 500mg/100ml.
3. Siapkan 7 tabung reaksi yang bersih dan kering kemudian isilah masing-masing dari keenam tabung dengan 1 ml larutan “glukosa terhidrolisa” tersebut dan 1 ml “aquadest terhidrolisa”.
4. Kedalam setiap tabung diatas, tambahkan 1 ml pereaksi Nelson (campuran sama banyak antara pereaksi Nelson A dan B). Tabung kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit.
5. Ambil semua tabung dan segera dinginkan dengan memasukkannya kedalam gelas kimia yang berisi air dingin.
6. Setelah dingin, temperatur mencapai sekitar 25°C yang diukur dengan termometer, tambahkan kedalam setiap tabung 1 ml pereaksi Arsenomolibdat. Vortex sampai semua endapan larut.
7. Tambahkan 7 ml aquadest. Vortex sampai homogen.
8. Baca serapan (absorbansi pada $\lambda 540$ nm) pada spektrofotometer.
9. Buat kurve standard.

5.3.4 Pembuatan larutan ”glukosa terhidrolisa standard 3”

Standard glukosa terhidrolisa standard 2 memiliki rentangan konsentrasi yang banyak, terdiri dari 6 jenis. Jumlah konsentrasi yang banyak ini memerlukan pereaksi yang lebih banyak pula. Untuk mengurangi pemakaian bahan pereaksi yang terlalu banyak maka dibuat standard 3. Jenis konsentrasi yang dipakai pada standard 3 ini adalah konsentrasi yang biasa digunakan dalam uji gula secara klinik yaitu: 0.5; 1; 1.5; dan 2%. Prosedur pembuatan larutan ”glukosa terhidrolisa standard 3 ” ini adalah seperti telah diuraikan pada Bab metode penelitian yaitu seksion 4.6.3, hal. 30-38. Pada uji ini digunakan larutan sukrosa autentik dengan konsentrasi 0.5; 1.0; 1.5 dan 2%. Setelah dihidrolisa

larutan ini mengalami pengenceran sebanyak 50% sehingga setelah menjadi glukosa terhidrolisa konsentrasinya adalah 0.25; 0.5; 0.75 dan 1%.

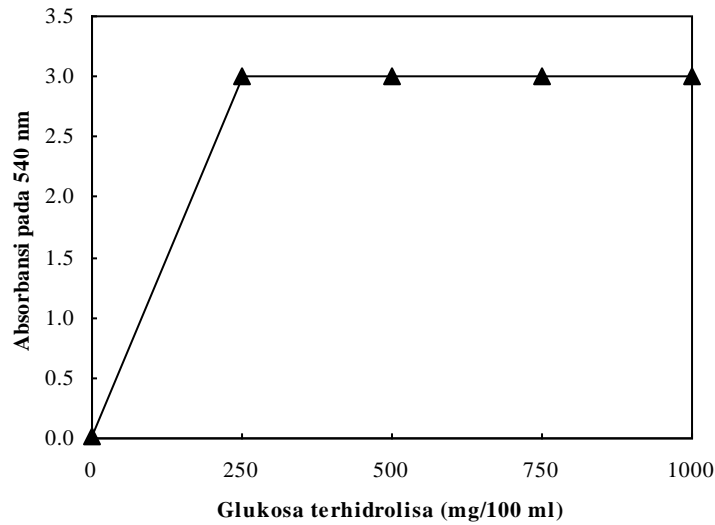
Rentangan konsentrasi standard 3 ini dapat mengakomodasi rentangan konsentrasi yang diperkirakan terdapat pada ekstrak. Menurut uji kualitatif, konsentrasi gula ekstrak dapat mencapai konsentrasi 0.5% atau 500 mg/100 ml.

Langkah-langkah pembuatan kurve standard 3 ini adalah sbb:

1. Siapkan pereaksi Nelson dengan mencampurkan 4 bagian Nelson A dan 1 bagian Nelson B. Campuran ini selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih sampai komponen-komponennya terlarut seluruhnya (Green et al. 1989).
2. Siapkan 5 larutan glukosa terhidrolisa yang masing-masing memiliki konsentrasi 250, 500, 750 dan 1000 mg/100 ml.
3. Siapkan 5 tabung dan isi masing-masing dengan 1 ml larutan glukosa terhidrolisa dan 1 tabung diisi dengan 1 ml larutan "aquadest terhidrolisa" sebagai larutan blanko.
4. Kedalam setiap tabung tambahkan 1 ml pereaksi Nelson. Tabung kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit.
5. Ambil semua tabung dan didinginkan dengan memasukkan kedalam gelas kimia yang berisi air dingin.
6. Setelah dingin tambahkan 1 ml pereaksi arsenomolibdat, vortex sampai semua endapan larut.
7. Tambahkan 7 ml aquadest, vortex sampai homogen.
8. Baca serapan dengan panjang gelombang 540 nm.
9. Buat kurva standard yang menunjukkan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi.

Tabel 5.19. Konsentrasi glukosa terhidrolisa dan data absorbansi hasil pengukuran menggunakan standard 3.

No. Tabung	Konsentrasi larutan standard (mg/100 ml)	Absorbansi pada λ 540 nm
1	0.00	0.010
2	250	3.000
3	500	3.000
4	750	3.000
5	1000	3.000



Gambar 5.3. Kurve standar 3. Pereaksi Nelson A dan B dicampur dengan perbandingan 4:1, konsentrasi gula terhidrolisa: 0, 250, 500, 750 dan 1000 mg/100 ml

Pengukuran menggunakan prosedur 5.3.3 diatas tidak dapat menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi. Seperti terlihat pada grafik, pada variasi konsentrasi yang diukur, absorbansi yang ditunjukkan adalah sama.

5.3.5 Pembuatan larutan "glukosa terhidrolisa standard 4"

Untuk mengatasi permasalahan pada prosedur 5.3.3, maka dilakukan pengujian kembali dengan memodifikasi campuran pereaksi Nelson. Pada pengujian kembali ini, pereaksi Nelson A dan B dicampur sama banyak sebelum ditambahkan pada tabung yang berisi larutan glukosa terhidrolisa. Langkah-langkah yang dilakukan untuk pembuatan kurve standar 4 menjadi sbb:

Langkah-langkah pembuatan kurve standar 4:

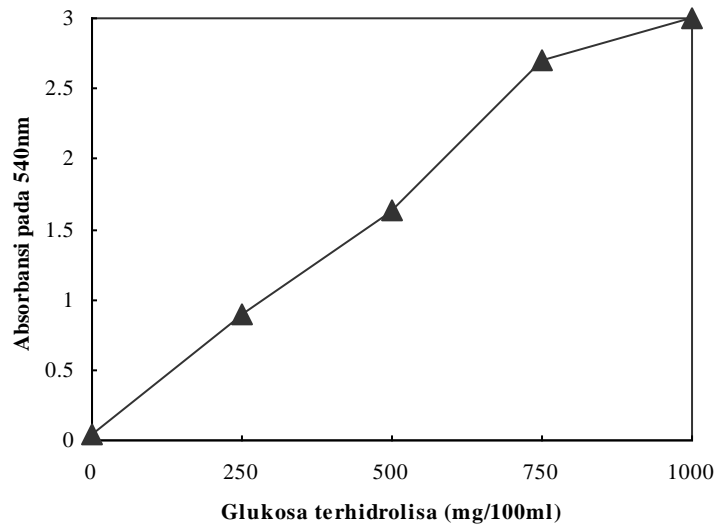
- 1 Siapkan pereaksi Nelson dengan mencampurkan 1 bagian Nelson A dan 1 bagian Nelson B. Campuran ini selanjutnya divortex sampai homogen (untuk referen dapat dibaca Green et al. 1989).
- 2 Siapkan 5 larutan glukosa terhidrolisa yang masing-masing memiliki konsentrasi 250, 500, 750 dan 1000 mg/100 ml.

3. Siapkan 5 tabung dan isi masing-masing dengan 1 ml larutan glukosa terhidrolisa dan 1 tabung diisi dengan 1 ml larutan "aquadest terhidrolisa" sebagai larutan blanko.
4. Kedalam setiap tabung tambahkan 1 ml pereaksi Nelson. Tabung kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit.
5. Ambil semua tabung dan didinginkan dengan memasukkan kedalam gelas kimia yang berisi air dingin.
6. Setelah dingin tambahkan 1 ml pereaksi arsenomolibdat, vortex sampai semua endapan larut.
7. Tambahkan 7 ml aquadest, vortex sampai homogen.
8. Baca serapan dengan panjang gelombang 540 nm.
9. Buat kurva standard yang menunjukkan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi

Tabel 5.20. Hasil pengukuran absorbansi menggunakan prosedur 5.3.4

No. Tabung	Konsentrasi larutan standard (mg/100 ml)	Absorbansi pada λ 540 nm
1	0.00	0.040
2	250	0.900
3	500	1.639
4	750	2.699
5	1000	3.000

Apabila data ini digambarkan dengan grafik maka hubungan konsentrasi dan absorbansi akan tampak berkorelasi positif. Oleh karena itu, untuk mengukur kadar sukrosa pada sampel digunakan prosedur 5.3.4 ini.



Gambar 5.4. Kurve standard 4. Pereaksi Nelson A dan B dicampur sama banyak, konsentrasi gula terhidrolisa: 0, 250, 500, 750 dan 1000 mg/100 ml.

5.3.6 Pengukuran kadar glukosa terhidrolisa pada sampel.

Untuk mengetahui kadar sukrosa pada sampel secara kuantitatif, hasil pengukuran absorbansi terhadap larutan glukosa terhidrolisa standard dimasukkan kedalam tabel statistik (Tabel 5.21). Larutan glukosa terhidrolisa standard tersebut adalah glukosa terhidrolisa standard 4 (prosedur 5.3.4) karena menunjukkan korelasi positif antara konsentrasi dan absorbansi. Tabel statistik yang digunakan adalah tabel untuk menghitung nilai a dan b dalam persamaan Least-Squares yang menjelaskan satu garis lurus dengan rumus $X = aY + b$ (sebagai referensi dapat dibaca Estien Yazid dan Lisda Nursanti 2006).

Keterangan:

X (absis) = kadar larutan sukrosa standard (%)

Y (ordinat) = Absorbansi

a dan b = tetapan yang dihitung dari persamaan:

$$a = \frac{N(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{N(\sum Y^2) - (\sum Y)^2}$$

$$b = \frac{(\Sigma Y^2)(\Sigma X) - (\Sigma Y)(\Sigma XY)}{N(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2}$$

Tabel 5.21. Tabel statistik untuk menghitung nilai a dan b melalui pengukuran absorbansi glukosa standard 4.

No	Kadar larutan sukrosa standar dalam prosen (X)	Absorbansi (Y)	XY	Y ²
1	0.25	0.900	0.225	0.81
2	0.5	1.639	0.8195	2.686321
3	0.75	2.699	2.02425	7.284601
4	1	3.000	3	9
$\Sigma N=4$	$\Sigma X=2.5$	$\Sigma Y=8.238$	$\Sigma XY=6.0687$	$\Sigma Y^2=19.780$

Dengan menggunakan data pada tabel statistik, maka nilai a dan b dapat dihitung sbb:

$$a = \frac{N(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{N(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2} = \frac{4(6.0687) - (2.5)(8.238)}{4(19.780) - (8.238)^2} = \frac{3.6798}{11.25} = 0.327$$

$$b = \frac{(\Sigma Y^2)(\Sigma X) - (\Sigma Y)(\Sigma XY)}{N(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2} = \frac{(19.780)(2.5) - (8.238)(6.0687)}{4(19.780) - (8.238)^2} = -0.048$$

Setelah absorbansi pada masing-masing sampel diukur menggunakan langkah-langkah seperti pengukuran gula standard 4, konsentrasi sukrosa secara kuantitatif pada sampel dapat dihitung dengan menggunakan rumus $X=aY+b$. Contoh: jika absorbansi sampel adalah 0.9 maka konsentrasi (X) = $0.327 \cdot 0.9 + (-0.048) = 0.2463$. Jumlah ini hampir sama dengan larutan standard dengan konsentrasi 0.25% atau 250 mg/100 ml yang memiliki absorbansi = 0.9.

5.3.6.1 Kadar sukrosa pada ekstrak panili setelah diberikan unsur hara tambahan dengan dosis standard (Eksperimen 1).

Dari pengukuran absorbansi menggunakan standard 4, diperoleh data seperti tabel berikut ini (Tabel 5.22). Dengan menggunakan nilai a dan b yang didapat dari standard 4, konsentrasi sukrosa pada masing-masing sampel ekstrak tanaman dapat dihitung menggunakan rumus $X=aY+b$. Hasil penghitungan ini adalah berupa konsentrasi (%) yang selanjutnya dapat diubah menjadi konsentrasi mg/100 ml.

Tabel 5.22. Konsentrasi glukosa terhidrolisa (Sukrosa) pada ekstrak sampel yang diukur menggunakan metode Nelson-Somogyi pada experiment 1. Sampel tanaman ini dipanen pada hari yang sama dengan pemberian pupuk (T0), 10 Hari setelah pemberian pupuk (T1) dan 20 Hari setelah pemberian pupuk (T2). Tambahkan unsur hara yang diberikan adalah Urea, 9.25 g/pohon; TSP 1.1 g/pohon dan KCl 4.6 g/pohon.

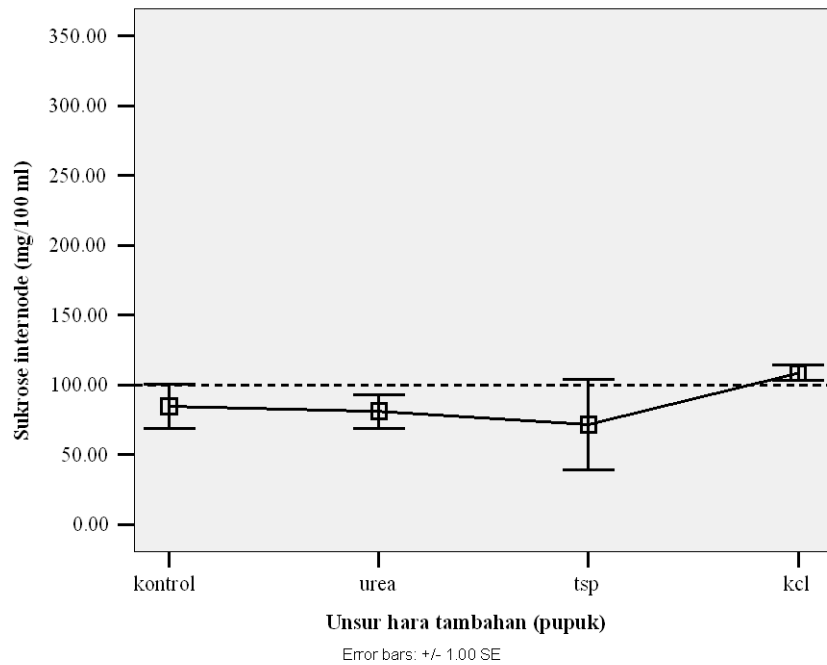
Expt.1 T0						
No	Ekstraks	Absorbansi (Y)	a	b	Konsentrasi (%)	Sukrose (mg/100ml)
1	Blanko	0.032	0.327	-0.048	-0.037536	-37.536
2	Kontrol daun	0.333	0.327	-0.048	0.060891	60.891
3	Kontrol batang	0.371	0.327	-0.048	0.073317	73.317
4	Urea daun	0.263	0.327	-0.048	0.038001	38.001
5	Urea batang	0.315	0.327	-0.048	0.055005	55.005
6	TSP daun	0.276	0.327	-0.048	0.042252	42.252
7	TSP Batang	0.449	0.327	-0.048	0.098823	98.823
8	KCl daun	0.185	0.327	-0.048	0.012495	12.495
9	KCl batang	0.334	0.327	-0.048	0.061218	61.218

Expt.1 T1						
No	Ekstraks	Absorbansi (Y)	a	b	Konsentrasi (%)	Sukrose (mg/100ml)
1	Blanko	0.064	0.327	-0.048	-0.027072	-27.072
2	Kontrol daun	0.346	0.327	-0.048	0.065142	65.142
3	Kontrol batang	0.327	0.327	-0.048	0.058929	58.929
4	Urea daun	0.227	0.327	-0.048	0.026229	26.229
5	Urea batang	0.349	0.327	-0.048	0.066123	66.123
6	TSP daun	0.198	0.327	-0.048	0.016746	16.746
7	TSP Batang	0.177	0.327	-0.048	0.009879	9.879
8	KCl daun	0.174	0.327	-0.048	0.008898	8.898
9	KCl batang	0.424	0.327	-0.048	0.090648	90.648

Expt.1 T2						
No	Ekstraks	Absorbansi (Y)	a	b	Konsentrasi (%)	Sukrose (mg/100ml)
1	Blanko	0.056	0.327	-0.048	-0.029688	-29.688
2	Kontrol daun	0.206	0.327	-0.048	0.019362	19.362
3	Kontrol batang	0.229	0.327	-0.048	0.026883	26.883
4	Urea daun	0.225	0.327	-0.048	0.025575	25.575
5	Urea batang	0.23	0.327	-0.048	0.02721	27.21
6	TSP daun	0.179	0.327	-0.048	0.010533	10.533
7	TSP Batang	0.182	0.327	-0.048	0.011514	11.514
8	KCl daun	0.209	0.327	-0.048	0.020343	20.343
9	KCl batang	0.388	0.327	-0.048	0.078876	78.876

Hasil pengukuran kadar sukrosa kuantitatif dengan Metode Nelson-Somogyi ini (Tabel 5.22) secara umum konsisten dengan pengukuran kualitatif dengan uji Benedict terutama pada tanaman yang diberi tambahan unsur hara (Tab.5.6), yang menunjukkan bahwa kadar sukrosa pada internode lebih tinggi dari pada daun. Uji statistik terhadap

kadar sukrosa pada internode ini ternyata juga konsisten dengan uji kualitatif yaitu bahwa penambahan unsur hara dengan dosis standard tidak dapat menaikkan kadar sukrosa. Kadar sukrosa yang ditemukan adalah sangat rendah dan apabila konsentrasi yang ditemukan pada T0,T1 dan T2 dirata-ratakan nilainya hampir sama dengan kontrol, kecuali pada pemberian KCl.



Gambar 5.5. Rata-rata kadar sukrosa internode dari T0,T1 dan T2 pada Expt.1

Secara statistik, perbedaan kadar sukrosa yang dianalisa dengan ANOVA menggunakan SPSS ternyata tidak signifikan. Jadi hasil uji kualitatif maupun kuantitatif kadar sukrosa pada tanaman panili, setelah diberi unsur hara tambahan berupa pupuk NPK dengan dosis standar, adalah sama yaitu tidak menaikkan kadar sukrosa secara berarti.

5.3.6.2 Kadar sukrosa pada ekstraks panili, setelah diberi tambahan unsur hara dengan dosis 2x dosis standard (eksperiment 2).

Pada eksperiment 2, kadar sukrosa internode sebagian besar ditemukan lebih tinggi dari pada kadar sukrosa daun. Hasil ini sama dengan data yang ditemukan pada experiment 1, sehingga translokasi dan penyimpanan sukrosa ke internode mungkin merupakan suatu mekanisme fisiologis yang terjadi pada tanaman panili dan tidak

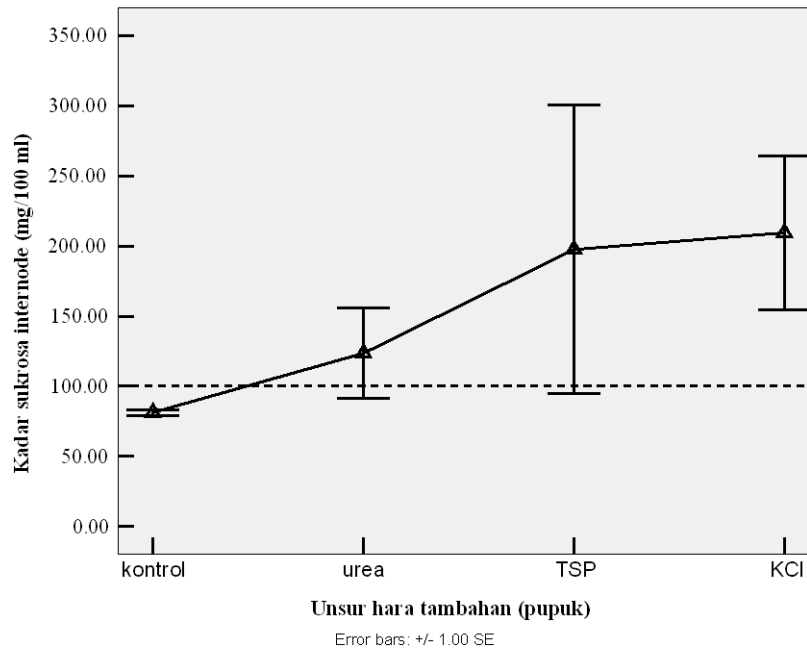
semata-mata disebabkan oleh kenaikan atau penurunan unsur hara yang tersedia. Hal ini dapat dilihat pada tabel berikut ini (Tabel 5.23).

Tabel 5.23. Konsentrasi glukosa terhidrolisa (sukrosa) pada ekstrak sampel yang diukur menggunakan metode Nelson-Somogyi pada experiment 2. Sampel tanaman ini dipanen pada hari yang sama dengan pemberian pupuk (T0), 11 Hari setelah pemberian pupuk (T1) dan 24 Hari setelah pemberian pupuk (T2). Tambahan unsur hara yang diberikan adalah Urea, 18.5 g/pohon; TSP 2.2 g/pohon dan KCl 9.2 g/pohon.

Expt.2 T0						
No	Ekstraks	Absorbansi (Y)	a	b	Konsentrasi (%)	Sukrose (mg/100ml)
1	Blanko	0.063	0.327	-0.048	-0.027399	-27.399
2	Kontrol daun	0.255	0.327	-0.048	0.035385	35.385
3	Kontrol batang	0.319	0.327	-0.048	0.056313	56.313
4	Urea daun	0.225	0.327	-0.048	0.025575	25.575
5	Urea batang	0.281	0.327	-0.048	0.043887	43.887
6	TSP daun	0.343	0.327	-0.048	0.064161	64.161
7	TSP Batang	0.313	0.327	-0.048	0.054351	54.351
8	Kcl daun	0.276	0.327	-0.048	0.042252	42.252
9	KCl batang	0.51	0.327	-0.048	0.11877	118.77
Expt.2 T1						
No	Ekstraks	Absorbansi (Y)	a	b	Konsentrasi (%)	Sukrose (mg/100ml)
1	Blanko	0.089	0.327	-0.048	-0.018897	-18.897
2	Kontrol daun	0.441	0.327	-0.048	0.096207	96.207
3	Kontrol batang	0.324	0.327	-0.048	0.057948	57.948
4	Urea daun	0.306	0.327	-0.048	0.052062	52.062
5	Urea batang	0.447	0.327	-0.048	0.098169	98.169
6	TSP daun	0.258	0.327	-0.048	0.036366	36.366
7	TSP Batang	0.419	0.327	-0.048	0.089013	89.013
8	Kcl daun	0.184	0.327	-0.048	0.012168	12.168
9	KCl batang	0.59	0.327	-0.048	0.14493	144.93
Expt.2 T2						
No	Ekstraks	Absorbansi (Y)	a	b	Konsentrasi (%)	Sukrose (mg/100ml)
1	Blanko	0.044	0.327	-0.048	-0.033612	-33.612
2	Kontrol daun	0.208	0.327	-0.048	0.020016	20.016
3	Kontrol batang	0.299	0.327	-0.048	0.049773	49.773
4	Urea daun	0.35	0.327	-0.048	0.06645	66.45
5	Urea batang	0.602	0.327	-0.048	0.148854	148.854
6	TSP daun	0.236	0.327	-0.048	0.029172	29.172
7	TSP Batang	1.276	0.327	-0.048	0.369252	369.252
8	Kcl daun	0.39	0.327	-0.048	0.07953	79.53
9	KCl batang	1.018	0.327	-0.048	0.284886	284.886

Akan tetapi, apabila unsur hara yang tersedia dinaikkan dengan pemberian unsur hara tambahan dengan dosis 2 x dosis standard, maka kadar sukrosa ditemukan sangat tinggi

terutama pada internode. Hal ini dapat dilihat pada grafik rata-rata kadar sukrosa internode dari T0, T1 dan T2 .



Gambar 5.6. Rata-rata kadar sukrosa dari T0,T1 dan T2 pada internode, Expt.2.

Dibandingkan dengan kontrol, kadar sukrosa yang ditemukan pada internode ini naik sampai 200%. Kenaikan yang tinggi ditemukan pada pemberian tambahan unsur hara P dan potassium. Pemberian tambahan unsur hara N sebanyak 18.5 g/pohon juga menaikkan kadar sukrosa, sedangkan pemberian 2.2g/pohon TSP dan 9.2 g/pohon KCl menaikkan kadar sukrosa rata-rata sampai mencapai jumlah yang tinggi yaitu sekitar 200 mg/100 ml.

Data kuantitatif yang ditemukan pada eksperimen 2 ini tidak terlalu jauh berbeda dengan data kualitatif . Misalnya, pada T1 ditemukan bahwa kadar surosa internode Urea lebih tinggi dari TSP (Tabel 5.14) dan pada T2, ekstrak internode TSP dan KCl lebih tinggi dari Urea (Tab. 5.15). Data ini konsisten dengan uji kuantitatif. Namun demikian, sangat bisa disadari bahwa membandingkan intensitas warna secara makroskopis lebih sulit dari spektrofotometris, apalagi untuk pengamatan yang dilakukan pada hari yang berbeda. Namun demikian, walaupun ditemukan kenaikan yang cukup tinggi pada

pemberin pupuk dengan dosis yang 2x lipat, tetapi secara statistik kenaikan tersebut tidak signifikan. Analisa statistik menggunakan SPSS memperlihatkan tabel anova sebagai berikut:

Tabel 5.24 Tabel anova "Tests of Between-Subjects Effects"

Dependent Variable: VAR00002

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	33527.624(a)	3	11175.875	1.018	.434
Intercept	280840.072	1	280840.072	25.574	.001
VAR00001	33527.624	3	11175.875	1.018	.434
Error	87850.870	8	10981.359		
Total	402218.566	12			
Corrected Total	121378.494	11			

a. R Squared = .276 (Adjusted R Squared = .005)

Tabel 5.25. Multiple Comparisons dengan uji LSD

Dependent Variable: VAR00002
LSD

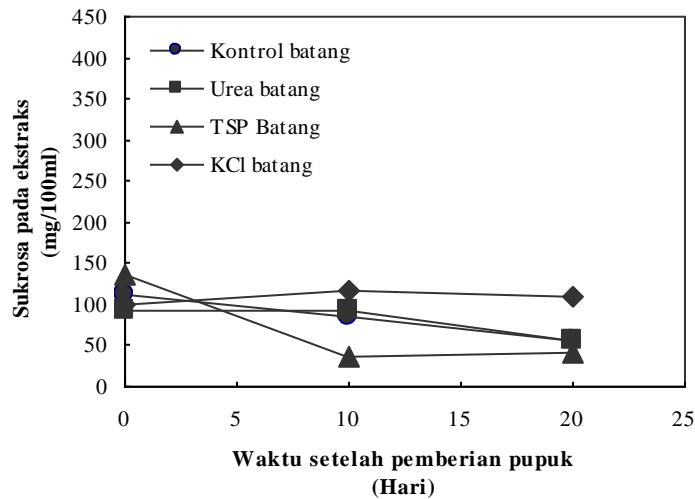
KCl	kontrol	128.1840	85.56229
	TSP	11.9900	85.56229
	Urea	85.8920	85.56229
kontrol	KCl	-128.1840	85.56229
	TSP	-116.1940	85.56229
	Urea	-42.2920	85.56229
TSP	KCl	-11.9900	85.56229
	kontrol	116.1940	85.56229
	Urea	73.9020	85.56229
Urea	KCl	-85.8920	85.56229
	kontrol	42.2920	85.56229
	TSP	-73.9020	85.56229

Based on observed means.

5.3.6.3 Perubahan biosintesis sukrosa setelah pemberian pupuk.

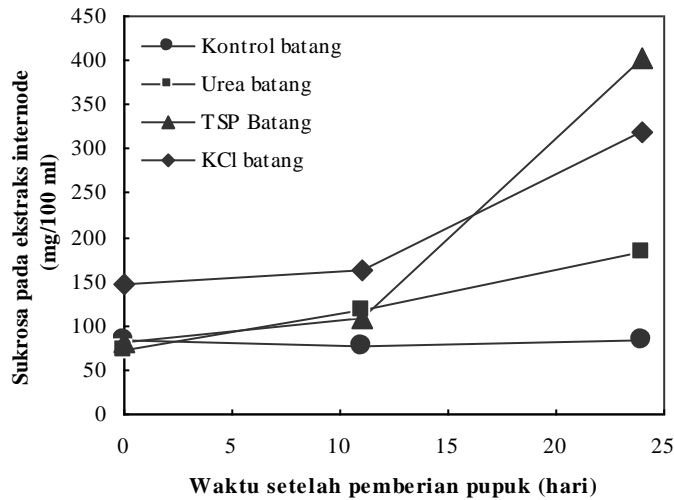
Kadar sukrosa yang ditemukan pada ekstrak tidak berubah secara berarti apabila pupuk yang diberikan adalah dosis standard (Eksp.1). Setelah 10 hari dan 20 hari pemberian pupuk, kadar sukrosa yang ditemukan pada ekstrak tidak naik dari kadar yang mula-mula dideteksi pada T0. Hal ini kemungkinan menunjukkan bahwa unsur hara

yang diberikan tidak meningkatkan perangkat fotosintesis pada tanaman sehingga sukrosa sebagai hasil fotosintesis juga tidak dapat naik (gambar 5.7).



Gambar 5.7. Perubahan kadar sukrosa pada ekstrak internode tanaman panili setelah diberi pupuk pada dosis standard (Expt. 1).

Berbeda dengan pemberian dosis standard, pemberian pupuk NPK dengan dosis 2x dosis standard yaitu: Urea 18.5 g, TSP 2.2 g dan KCl 9.6 g/pohon mampu menaikkan kadar sukrosa yang cukup tinggi jika dibandingkan dengan kadar sukrosa yang dideteksi pada T0 (Lihat gambar 5.8). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan unsur hara pada dosis yang lebih tinggi ini mampu meningkatkan perangkat fotosintesis sehingga dapat meningkatkan biosintesis sukrosa pada tanaman. Data kuantitatif yang didapat menggunakan metode Nelson Somogyi ini juga menunjukkan bahwa tanaman panili yang dibudidayakan di daerah penyangga hutan berada pada kondisi nutrisi yang masih rendah. Berdasarkan data kuantitatif ini, jika benar, dapat disimpulkan bahwa tanaman panili tersebut masih memerlukan tambahan unsur hara NPK. Walaupun dibudidayakan menggunakan stump dari leguminosae, penambahan unsur hara nitrogen juga masih diperlukan oleh tanaman panili.



Gambar 5.8. Perubahan kadar sukrosa pada ekstrak internode tanaman panili setelah diberi pupuk pada dosis 2x dosis standard (Expt. 2).

Respon tumbuhan setelah pemberian pupuk tunggal Urea, TSP dan KCl tersebut masih memerlukan uji lanjutan antara lain apakah tumbuhan akan memberi respon yang sama atau lebih baik jika satu pohon panili diberi pupuk N, P dan K. Seperti diketahui bahwa tanaman memerlukan komposisi unsur yang karakteristik, pemberian tambahan unsur hara tunggal kemungkinan menimbulkan respon yang berbeda dan bukan merupakan kumulasi dari masing-masing penambahan unsur tersebut.

5.4 Pembahasan

5.4.1 Kondisi pertumbuhan panili di perkebunan

Tanaman panili pernah menjadi primadona ekspor non migas, karena harganya cukup mahal sehingga dijuluki emas hijau. Akan tetapi, setelah terjadi serangan fusarium yang menghancurkan sentral-sentral produksi di Indonesia, berbagai usaha yang dilakukan nampaknya belum mampu mengembalikan tingkat produksi optimum seperti ketika mendapat julukan emas hijau. Salah satu kemungkinan penyebab adalah kondisi ketersediaan nutrisi tidak diketahui dan unsur hara tambahan yang diperlukan juga tidak diketahui.

Pemberian pupuk pada tumbuhan termasuk panili tanpa terlebih dahulu mengkaji unsur hara yang diperlukan tanaman menimbulkan kekhawatiran karena dapat merusak baik kondisi lahan maupun produksi tanaman yang dibudidayakan. Kekhawatiran ini dapat diatasi dengan beberapa cara a.l. pembatasan pemakaian pupuk sintetis atau melalui pertanian organik yang menggunakan motto "synthetic chemical free". Cara ini mungkin yang terbaik untuk memelihara kelestarian lingkungan tetapi memiliki keterbatasan dalam pemeliharaan keberlanjutan produktivitas tanaman budidaya. Hal ini terutama disebabkan karena pemindahan unsur hara oleh pemanenan jauh lebih cepat dari pada meneralisasi. Dengan asumsi bahwa pemeliharaan kelestarian lingkungan tanpa perbaikan produktivitas lahan tidak memperbaiki taraf hidup masyarakat, maka diperlukan pengembangan metode yang mampu memberi pedoman pemberian pupuk pada suatu dosis yang tidak merusak mekanisme penyediaan unsur hara melalui sistem alam yang ada. Akan tetapi, oleh karena laju perubahan unsur hara yang tersedia dapat sangat cepat, monitoring terhadap unsur yang tersedia perlu dilakukan dengan frekuensi yang lebih tinggi, a.l. melalui uji diagnostik. Misalnya, walaupun kondisi pertumbuhan panili masih sangat sulit untuk mencapai produksi optimal, teknik pemupukan tidak banyak diketahui. Hal ini tentu tidak menunjang usaha perbaikan produktivitas.

Studi tentang metode uji diagnostik sudah banyak dilakukan termasuk diantaranya adalah pengenalan ciri-ciri kekurangan suatu unsur hara pada tumbuhan. Ciri-ciri ini yang lebih dikenal dengan defisiensi simptom merupakan metode yang paling sederhana karena hanya memerlukan observasi terhadap perubahan visual yang terjadi pada tumbuhan, terutama pada warna daun. Walau metode ini mampu memberi petunjuk tentang jenis unsur hara yang kurang, tetapi petunjuk tersebut sering kurang jelas karena beberapa unsur dapat menunjukkan ciri defisiensi yang hampir sama. Kelemahan yang lain adalah gejala defisiensi ini bukan merupakan peringatan dini terhadap adanya kekurangan unsur hara. Misalnya, tumbuhan yang kekurangan nitrogen baru menampakkan simptom setelah persediaan nitrogen pada daun dewasa dirombak dan didistribusi ke daun yang lebih muda. Pada kasus ini, tumbuhan telah melakukan efisiensi yang terlalu tinggi sehingga produktivitas tumbuhan pada suatu lahan menjadi sangat rendah karena sedikitnya leaf area yang aktif berfotosintesis.

Uraian tersebut memperlihatkan bahwa untuk dapat memberi pupuk sesuai keperluan tanaman sangatlah rumit, pemberian pupuk sintetis yang tidak tepat dapat merusak dan menurut Rismunandar (1986) kajian tentang pemupukan untuk tanaman panili belum pernah ada, maka harapan untuk dapat meningkatkan pendapatan melalui budidaya panili nampaknya masih memerlukan kajian yang sangat banyak. Salah satu usaha yang mungkin dapat mengurangi situasi tersebut adalah dengan melakukan analisis "critical nutrient level". Cara ini sudah lama dikenal, akan tetapi penerapannya mungkin masih terlalu sulit terutama untuk tanaman panili.

Pengalaman yang dijumpai dilapangan dalam usaha memperbaiki pendapatan pada lahan perkebunan adalah melakukan introduksi suatu spesies tumbuhan yang memiliki nilai ekonomi tinggi seperti Vanili atau coklat. Pengenalan spesies baru pada lahan perkebunan ini didasarkan terutama pada nilai ekonomi dari produk tersebut seperti; pemasaran yang mudah, harga relatif tinggi dan stabil, pemeliharaan yang relatif tidak banyak. Pada tahun-tahun awal, spesies baru yang diperkenalkan dapat memperbaiki pendapatan karena produksi yang sangat baik. Akan tetapi, pada tahun-tahun berikutnya berbagai permasalahan kemudian ditemukan, misalnya tanaman sangat mudah terserang penyakit, produksi yang sangat rendah dan tidak adanya informasi tentang jenis unsur hara tambahan yang diperlukan untuk mengembalikan tingkat produksi. Pada tahap seperti ini kemudian muncul berbagai usaha yang lebih bersifat spekulatif. Pada beberapa kasus, usaha tersebut berhasil tetapi pada banyak kasus lainnya usaha yang dilakukan hampir tidak memperbaiki produksi.

Salah satu hal penting yang tidak banyak diperhitungkan dalam pengenalan spesies baru pada contoh pengalaman tersebut adalah tidak adanya pengujian nutrisi tanah pada tahap awal pengenalan tersebut. Uji inipun juga tidak dijumpai ketika kemudian terjadi berbagai permasalahan produksi. Sebagai akibatnya adalah tidak diketahuinya perubahan konsentrasi unsur hara tanaman yang mengakibatkan produksi berkurang sampai melebihi 10% yang dikenal sebagai batas kritis. Pemberian tambahan unsur hara, tanpa mengetahui unsur hara yang kurang, kemudian dilakukan secara spekulatif dan memiliki potensi yang sangat tinggi bagi terjadinya kerugian baik ekonomi maupun lingkungan.

Terdapat suatu dugaan bahwa tidak adanya uji unsur hara pada lahan diakibatkan karena kesulitan baik teknis maupun biaya. Dari segi teknis, uji unsur hara ini masih

relatif sangat sulit, sehingga walaupun uji ini kemudian dilakukan, biaya yang diperlukan terlalu tinggi apalagi dibandingkan dengan produksi lahan budidaya itu. Agar perbaikan produksi bahan pangan tidak sampai merusak kelestarian lingkungan maka usaha pengembangan metode diagnostik terus dilakukan tidak hanya karena perbaikan produksi tetapi juga karena perubahan keperluan unsur hara yang terjadi akibat perubahan vegetasi tanaman yang diintroduksi.

5.4.2 Teknik uji diagnostik sukrosa

Penelitian yang dilaporkan ini merupakan salah satu upaya pengembangan uji diagnostik yang bertujuan untuk mengetahui jenis unsur hara yang diperlukan oleh tumbuhan introduksi panili pada suatu lahan didaerah penyangga hutan Gunung batukaru. Uji ini menggunakan asumsi bahwa pemberian unsur hara sesuai jenis yang diperlukan tanaman akan menaikkan biosintesis sukrosa. Asumsi ini didasarkan pada teori bahwa pertumbuhan tergantung pada produksi sukrosa (Wang dan Nobel 1998) dan produksi sukrosa ini tergantung pada penyediaan unsur hara pada lahan (Gardner et al 1991).

Uji diagnostik sukrosa terdiri dari beberapa tahap yaitu: (1) pemberian pupuk Urea, TSP dan KCl pada sejumlah tumbuhan, (2) pengambilan sampel tanaman, (3) ekstraksi sukrosa, (4) Hidrolisa dan uji glukosa terhidrolisa. Setelah dilakukan 6 kali pengambilan sampel dalam 2 kali experiment maka ditemukan data kadar sukrosa kualitatif seperti disajikan dalam tabel 5.26.

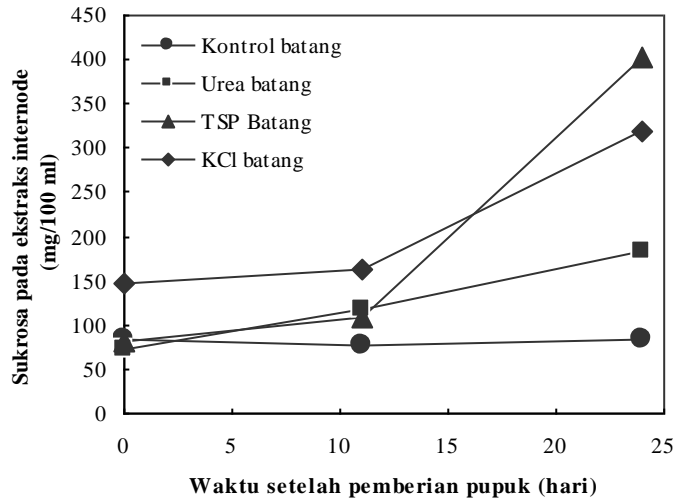
Pemberian pupuk dengan dosis standard tidak menunjukkan adanya perbedaan kadar sukrosa antara tanaman kontrol dan tanaman yang diberi pupuk baik Urea, TSP maupun KCl. Setelah dilakukan uji kuantitatif menggunakan metode Nelson-Somogyi, hasilnya ternyata konsiten dengan hasil uji kualitatif (Gambar 5.7). Hal ini kemungkinan disebabkan karena tanaman yang dibudidayakan secara multikultur di perkebunan mengalami persaingan yang sangat ketat dalam mendapatkan nutrient, baik secara alami maupun yang diberikan dalam bentuk pupuk. Dalam hal ini, tanaman panili mungkin memiliki afinitas yang lebih lemah dibandingkan dengan tanaman lainnya terhadap dosis pupuk standar yang diberikan.

Tabel 5.26. Hasil uji kualitatif terhadap kadar sukrosa pada tanaman panili yang diberi pupuk Urea, TSP dan KCl pada eksp. 1 dan 2. Dosis pupuk yang diberikan setiap pohon pada expt 1. adalah dosis standard yaitu 9.25 g, 1.1 g dan 4.6 g untuk Urea, TSP dan KCl. Dosis pupuk yang diberikan pada expt. 2 adalah sebanyak 2x dosis standard. Pupuk ini diberikan setelah dilarutkan dengan air ledeng. Perkiraan kadar sukrosa (Est. Suc. Conc.): <<0.5, sangat rendah dibanding konsentrasi larutan standard 0.5%; <0.5, lebih rendah dari 0.5%; ≈0.5, hampir sama dengan 0.5%

No.		Air	Kontrol		Urea		TSP		KCl	
			Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang	Daun	Batang
Eks 1 T0	WARN A	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan
	Est.Suc. Conc. (%)	0.00	<<0.5	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5
Eks 1 T1	WARN A	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan
	Est.Suc. Conc. (%)	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	0.00	0.00	<<0.5
Eks 1 T2	WARN A	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	Kuning keruh
	Est.Suc. Conc. (%)	0.00	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	≈0.5	0.5<
Eks 2 T0	WARN A	Biru jernih	Sedikit agak kehijauan	Hijau kekuningan	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Sedikit agak kehijauan	Biru jernih	Hijau kekuningan
	Est.Suc. Conc. (%)	0.00	<0.5	<0.5	0.00	≈0.5	0.00	<<0.5	0.00	<0.5
Eks 2 T1	WARN A	Biru jernih	biru	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	Endapan merah bata	biru	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan
	Est.Suc. Conc. (%)	0.00	0.00	<0.5	<0.5	≈0.5	0.00	<0.5	<0.5	<0.5
Eks 2 T2	WARN A	Biru jernih	Biru jernih	Hijau kekuningan	Biru jernih	Sedikit Agak kehijauan	Sedikit Agak kehijauan	Endapan Merah bata	Biru jernih	Endapan Merah bata
	Est.Suc. Conc. (%)	0.00	0.00	<0.5	0.00	<<0.5	<<0.5	≈0.5	0.00	≈0.5

Setelah dosis pupuk dinaikkan menjadi 2 x dosis standard, ditemukan kenaikan kadar sukrosa pada ekstrak tumbuhan yang diberi pupuk. Data kualitatif memperlihatkan bahwa pada dosis yang lebih tinggi ini, pemberian Urea sebanyak 18.2 g /pohon lebih banyak memperlihatkan perbaikan biosintesis sukrosa dibandingkan dengan pemberian TSP maupun KCl, terutama pada sampel yang diambil pada T0 dan T1. Setelah dibandingkan dengan larutan standard, konsentrasi sukrosa pada tanaman yang diberi Urea adalah hampir sama dengan 0.5%. Tumbuhan yang diberi TSP dan KCl menunjukkan kadar sukrosa yang hampir sama dengan tanaman kontrol. Akan tetapi pada sampel T2, tanaman yang diberi TSP dan KCl justru memperlihatkan konsentrasi yang mendekati 0.5% sedangkan tanaman yang diberi Urea memperlihatkan konsentrasi

yang lebih rendah. Untuk mengetahui pengaruh pemberian pupuk dengan dosis yang lebih tinggi ini maka uji kuantitatif kemudian juga dilakukan. Pada uji ini ditemukan bahwa pemberian pupuk N, P, K pada dosis 2 x dosis standard menyebabkan kenaikan kadar sukrosa yang sangat tinggi. Relatif terhadap kadar sukrosa yang dideteksi pada T0, kadar sukrosa pada T2 adalah 217, 492 dan 256% pada tanaman yang dipupuk dengan Urea, TSP dan KCl. Untuk lebih jelasnya maka gambar 5.8 disajikan kembali sbb:



Dengan ditemukannya kenaikan biosintesis sukrosa pada kenaikan dosis pupuk ini maka dapat diduga bahwa tanaman panili mendapat unsur sesuai dengan jenis unsur yang diperlukan untuk meningkatkan biosintesis sukrosa. Seperti terlihat pada gambar 5.8, setelah dilakukan 3 x pemanenan sampel, pemberian TSP sebanyak 2.2 g/pohon pada eksperiment 2 menyebabkan kenaikan konsentrasi yang cukup tinggi dan lebih tinggi dari tanaman kontrol. Hasil yang serupa juga dijumpai pada tanaman panili yang diberi tambahan unsur hara pottassium dalam bentuk KCl. Pemberian pupuk ini sebanyak 9.6 g/pohon ditemukan menaikkan kadar sukrosa yang tinggi pada pemanenan ketiga (T2) yaitu pemanenan yang dilakukan 24 hari setelah pemberian pupuk. Perbedaan waktu yang ditunjukkan oleh tumbuhan untuk merespon pemberian 3 jenis pupuk ini kemungkinan diakibatkan oleh proses ionisasi. Walaupun dicampur dengan air pada waktu diaplikasikan, TSP adalah senyawa yang sukar larut, sehingga tanaman memberi respon cukup lambat. Akan tetapi kemungkinan ini tidak dapat menjelaskan respon tumbuhan terhadap pemberian KCl. Pupuk KCl ini termasuk senyawa ion, sangat mudah

larut didalam air, akan tetapi mekanisme penyerapannya memerlukan adanya pompa. Dengan demikian penyerapannya pun tidak terlalu mudah, tergantung pada kondisi lahan dan tumbuhan yang ada. Dalam penyediaan dan penyerapan unsur hara ini memang diakui memerlukan mekanisme yang sangat kompleks dan mungkin tidak dapat didiskusikan hanya melalui uji sukrosa karena biosintesis sukrosa ini lebih banyak merupakan mekanisme pemanenan energi matahari.

Dalam suatu kompleksitas proses, penelitian ini menemukan bahwa pemberian Urea dapat meningkatkan biosintesis sukrosa pada tanaman. Apabila digunakan asumsi bahwa pemberian unsur hara tambahan sesuai kebutuhan akan menaikkan produksi sukrosa, maka data yang ditemukan tersebut mengisyaratkan adanya defisiensi unsur hara nitrogen bagi pertumbuhan panili pada lahan tersebut. Akan tetapi data tersebut menimbulkan beberapa pertanyaan terutama tentang mekanisme penyediaan unsur hara nitrogen ini. Tanaman panili yang dibudidayakan dengan menggunakan stump dari pohon Leguminosae secara teori akan mendapat unsur hara N dalam jumlah yang cukup besar karena dapat tersedia melalui mineralisasi dari daun atau tersedia karena bantuan bakteri N yang bersimbiosa dengan leguminosae. Oleh karena itu, secara teori tanaman panili tentu tidak kekurangan nitrogen. Unsur hara yang lebih mungkin defisien adalah unsur hara yang tidak bisa tersedia dengan mekanisme simbiotik atau mineralisasi bahan organik tanaman leguminosae seperti P dan K. Namun demikian setelah dilakukan pemanenan pada hari ke 24, ternyata pemberian TSP dan KCl menunjukkan kadar gula yang tinggi sedangkan pemberian Urea justru menunjukkan kadar gula yang rendah.

Variasi kadar gula setelah diberi pupuk ini, pada penelitian lapangan, dapat dipengaruhi berbagai faktor terutama karena vegetasi tanaman yang sangat heterogen, dapat menyebabkan heterogenya komposisi nutrient yang tersedia. Hal ini selanjutnya menyebabkan pemberian unsur hara yang sama akan menyebabkan terjadinya respon yang berbeda. Dengan demikian pada kondisi ini diperlukan suatu penilaian status nutrisi tumbuhan dan uji ketersediaan unsur hara pada tanah untuk menetapkan suatu batas kritis.

Walaupun nilai batas kritis tidak dapat ditetapkan berdasarkan uji diagnostik sukrosa ini, spekulasi pemberian pupuk dapat dikurangi. Misalnya, jumlah TSP 2.2 g/pohon dan KCl 9.6 g/pohon sudah cukup tinggi untuk menaikkan kadar sukrosa yang merupakan

bahan yang menentukan pertumbuhan tanaman. Oleh karena itu penggunaan dosis ini dianggap tidak membahayakan pertumbuhan atau mungkin lingkungan. Seandainya jumlah ini tidak diketahui, maka pemberian pupuk mungkin dilakukan secara spekulatif dan sangat potensial merugikan baik pertumbuhan tanaman ataupun lingkungan.

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Cara yang ideal untuk menentukan tambahan unsur hara tanaman adalah dengan uji unsur hara tanah dan uji unsur hara jaringan. Akan tetapi apabila uji ini tidak dapat dilakukan karena permasalahan teknis atau biaya, maka alternatif yang mungkin dilakukan adalah uji diagnostik sukrosa. Dengan asumsi bahwa pemberian unsur hara sesuai keperluan akan menaikkan biosintesis sukrosa yang diperlukan bagi perbaikan pertumbuhan, uji diagnostik ini mampu mengetahui apakah tumbuhan masih memerlukan unsur hara tambahan. Kemampuan uji ini kemudian menyebabkan spekulasi pemberian pupuk dapat dikurangi. Misalnya, pada kondisi penelitian yang dilakukan ditemukan bahwa pemberian N, P dan K dapat menaikkan kadar sukrosa sebanyak 2.5, 4.9 dan 2.1 kali (relatif T₀). Dari data ini didapat petunjuk bahwa tanaman panili yang dibudidayakan secara multikultur pada suatu lahan di kawasan penyangga hutan masih memerlukan tambahan unsur hara berupa pupuk dengan dosis: Urea 18.5 g/pohon, TSP 2.2 g/pohon dan KCl 9.2 g/pohon.

Namun demikian, uji diagnostik ini adalah uji tidak langsung terhadap unsur hara tambahan yang diperlukan oleh tanaman. Oleh karena itu, apabila secara teknis atau biaya memungkinkan, uji diagnostik ini dapat dilengkapi dengan analisis jaringan tanaman.

6.2 Saran-saran

Karena pemberian pupuk yang keliru dapat merugikan baik dari segi ekonomi maupun kelestarian lingkungan, maka evaluasi unsur hara perlu dilakukan sebelum pemberian pemupukan terutama diareal perkebunan yang memerlukan jumlah pupuk yang cukup banyak.

Untuk meningkatkan pendapatan melalui intensifikasi perkebunan, teknik pemupukan perlu diperbaiki a.l. dengan uji diagnostik sukrosa sehingga dapat mengurangi pemborosan sumber alam yang juga dapat merusak kelestarian lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiputra I G K. 2005. The study of the effect of temperatur on the growth of lateral bud in pre and post-fertilized Vanilla vines. Hasil Penelitian ,tidak dipublikasikan, disimpan di Perpustakaan.
- Adiputra, I G K. and Anderson, J.W. 1992. Distribution and redistribution of sulphur taken up from nutrient solution during vegetative growth in barley. *Physiol. Plant.* 85: 453-460.
- Adiputra, I G.K., Suardana, AA. Km., Sumarya, I Md., Israil Sitepu, Sudiartawan, P. 2007. Perubahan biosintesis sukrosa sebelum pertumbuhan kuncup ketiak pada panili (*Vanilla planifolia*). Laporan penelitian Hibah bersaing I, Program studi Biologi, Fak. MIPA, Universitas Hindu Indonesia, Denpasar.
- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K, Watson JD. 1983. *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. New York and London.
- Boedijn KB, Kuperus JR, Soeparma Satiadiredja 1973. *Botani B*. Penerbit pradnya paramita, Jakarta, Jl Madium 8.
- Budi, I Md, Sumer I Md, Toya Wiartha I Ny, Adioka I GM. 1990. *Ilmu Farmasi kedokteran*. Lab. Farmasi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- Campbell CR dan Plank CO. 2000. *Foundation for practical application of plant analysis*. (<http://www.ncagr.com/agronomi/saesd/sectl.htm>).
- Estien Yazid dan Lisda Nursanti 2006. *Penuntun Praktikum Biokimia untuk mahasiswa analis*. Penerbit ANDI, Yogyakarta.
- Foley ME, Bancal MO, and Nichols MB. 1992. Carbohydrate status in dormant and afterripped excised wild oat embryos. *Physiol. Plant.* 85: 461-466.
- Foth D. 1995. *Dasar-dasar Ilmu Tanah*. Gadjah Mada University Press.
- Gandasoebrata R. 2007. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Penerbit Dian Rakyat, Jakarta.
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RL. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Penerbit Universitas Indonesia.
- Ghozali I. 2007. *Aplikasi analisis multivariate dengan program SPSS*. Badan Penerbitan Universitas Diponegoro.

- Gojon A, Bussi C, Grignon C and Salsac L. 1991. Distribution of NO_3^- reduction between root and shoots of peach-tree seedlings as affected by NO_3^- uptake rate. *Physiol. Plant.* 82:505-512.
- Green F, Clausen, CA, Highley TL. 1989. Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing-sugar assay to a microassay using micro titer plates. *Analytical Biochemistry* 182:197-199.
- Lakitan B. 1993. Dasar-dasar fisiologi tumbuhan. Divisi Buku Perguruan Tinggi, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Larson PR and Gordon JC. 1969. Leaf development, Photosynthesis and C^{14} distribution in *Populus deltoides* seedling. *Amer. J. Bot.* 56:1058-1066.
- Lehninger L. 1988. Dasar-dasar Biokimia. Jilid 1. Penerbit Erlangga. Jl. Kramat IV, No. 11, Jakarta 10420.
- Leopold AC and Kriedemann PE. 1979. Plant growth and development. TMH edition. – Tata Mc Grow-Hill Publishing Company Ltd. New Delhi.
- McCray JM, Ezenwa I V, Rice RW, Lang TA. Sugarcane Plant Nutrient Diagnosis. (<http://edis.ifas.ufl.edu>. BODY_SCO75).
- Miftahudin, Nurlaela, Juliarni 2007. Uptake and distribution of aluminium in root apices of two rice varieties under aluminium stress. *Hayati Journal of Biosciences*; Vol. 14 No.3.
- Mul Mulyani Sutedjo 1992. Analisis Tanah, Air dan Jaringan tanaman. Penerbit PT. Rineka Cipta, Jakarta.
- Palguna AAB. 1986. Statistik pengantar Edisi II, Lab. Statistika dan Matematika, Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Pate JS. 1980. Transport and partitioning of nitrogen solution. – *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:313-340.
- Rismunandar 1989. Bertanam panili. Seri Pertanian-XXXIII/108/87. Penerbit Penebar Swadaya.
- Smith IK. 1976. Characterization of sulfate transport in cultured tobacco cells. – *Plant Physiol.* 58:358-362.
- Sudana M, Suprpta DN, Rai Maya Temaja G. 2007. Organik vegetabel cultivation experiment in Bali. Faculty of Agriculture, Udayana University, Bali.

- Sudarka W. 1987. Pertanian dan Perkebunan. Dalam materi pembekalan Kuliah Kerja Nyata, Universitas Udayana, Denpasar, Bali.
- Suprpta DN. 2007. Biopesticides to kontrol Plant Pest in Organik Farming System. International Symposium "Utilization of bioagents to develop organik farming system". School for Post graduates Studies, Udayana University. Jl. PB. Sudirman, Denpasar.
- Thorpe NO. 1984. Cell Biology. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Wang N and Nobel PS. 1998. Phloem transport of fructans in the Crassulacean Acid Metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiol*: 116(2).

DRAF ARTIKEL ILMIAH

Sucrose diagnostik test for identification of nutrient supplement

In Vanilla plants

I GEDE KETUT ADIPUTRA

Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Sciences,
Hindu Indonesia University.

Jl. Sangalangit, Tembau, Penatih, Denpasar, Bali, Indonesia.

Phone/fax: (0361) 464700/0361464800. E-mail: dr_gede_adiputra@yahoo.co.id

Running title: Sucrose diagnostik test

Abstract

Plant growth is depended on photosynthetic rate and this biosynthesis is subsequently depended on nutrient available. In soil, nutrient available is greatly varied in different soil as well as species grown. Therefore, in the interest of sustainable farming and ecology, identification of proper nutrient supplement is becoming critical. One most resent methods that have been developed for this identification was critical nutrient level. However, the amount of fertilizer still require by plants is remain unclear particularly because the mechanism of nutrient made available in soil is extremely complex. In order to identify the proper amount of fertilizer in the heterogen soil conditions, methods employed should allow a direct measurement of plant respond to the standard amount of fertilizer added. In this paper, sucrose concentration in Vanilla plants was monitored after addition of Urea, TSP and KCl. This experiment found that addition of 18.5 g Urea,

2.2 g TSP and 9.6 g KCl/plant increased sucrose content, but addition of fertilizer in that lower amount did not show enhancement of sucrose concentrations. It is concluded that sucrose diagnostik test could identify the sufficient amount of fertilizer to be added to support normal growth or crop productions.

Key words: Diagnostik, sucrose, Vanilla, NPK.

INTRODUCTION

Plant nutrition has been studied for a long period of time and one important finding in the study was essential elements which involved in the synthesis of structural or functional molecules in plants. Concentration of these essential elements, which usually also refer to the plant nutrient, could directly affected the rate of photosynthesis. Phosphorus for example, which is regarded as nonrenewable resources, affected crop production for more than 30% (Vance et al. 2003). In dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*), withdrawn of phosphorus supply resulted in the inhibition of leaf growth and when phosphorus was then added into the phosphorus deficient plants, photosynthetic activities was then increased in 3-48 h (Sawada et al.1982). In other studies, net rate of photosynthetic CO₂ fixation was found decreased into one-third of the kontrol rate after phosphorus was cut off from nutrient (Terry and Ulrich 1973). Photosynthetic rate which is depends on the amount of nutrient available, subsequently affected growth and production in plants. According to Wang and Nobel (1998), plants growth depend on the supply of photosynthate via phloem to sink organs. The author found that sucrose was the

predominate sugar in the chlorenchym of mature green leaf. By using ^{14}C (Carbon), Wilcockson and Abuzeid (1991) found that current photosynthesis in a leaf Canopy was become the major source of assimilates for bud growth in *Brassica oleracea*. The important of phosphorus for the crop production resulted in the extensive use of this element and particularly in low phosphorus soil, phosphorus is usually supplied as concentrated phosphorus fertilizer (Bates and Lynch 2000).

Unlike phosphorus, nitrogen is regarded as relatively renewable resources, mostly taken up via root system as nitrate or ammonium (Gastal and Lemaire 2002). In soil, this nitrogen can be made available for plants growth by mineralization of legumes residues (Nakhone and Tabatabai 2008) or by the activities of symbiotic bacteria which allow atmospheric nitrogen available for plants (Albert et al. 1983, p. 1116). Even though, in an extensive agriculture, the rate of nitrogen fixation by symbiotic bacteria apparently unable to balance nitrogen removal because of harvest. Nitrogen is usually withdrawn from vegetative tissues, under condition of nitrogen deficiency (Barneix et al. 1992) and could significantly decreased crop production. In potato and wheat, increasing N limitation resulted in a linear decrease in crop dry weight (Delden 2001). However, under ample soil N availability, crop N accumulation is highly related to crop growth and to biomass accumulation (Gastal and Lemaire 2002). Therefore, synthetic nitrogen fertilizer is almost inevitable in an extensive agriculture.

The other macronutrient require by plants for growth was potassium. Although the main role of this element was in the transport mechanism in plants (Liu et al. 2006), this element is also affected macromolecules biosynthesis in plants. As shown by Kanai et al.

(2007), photosynthetic rate was decreased (relative kontrol) in tomato plants that grown with potassium deficiency.

The important of maintaining sufficient nutrient supply, particularly N, P, K, for plants growth in order to maintain crop production make the synthetic fertilizer is widely employed. However, as concerned by Bates and Lynch (2000), the use of fertilizer might not efficient, so it is become a considerable interest in agriculture and ecology. In relation to the use of synthetic fertilizer, some researcher showed that the application of improper synthetic chemical fertilizer resulted in the unbalances of soil mineral, the loss of soil microbe, water contamination and increasing production cost (Suprpta 2007, Sudana et al. 2007). According to Vance et al. 2003, for economic, humanitarian and environmental reasons, improvement of nutrient acquisition and use by plants is becoming critical.

In order to increase efficiency in the use of chemical fertilizer, it is require identifying a proper nutrient supplement into nutrient deficient plants. One method that has already been developed for identifying nutrient deficiency was critical nutrient level (CNL) which refers to the concentration of nutrient in plants that make crop production decreased to more than 10%(Lakitan 1993). This kind of method is based on the scientific principle that healthy plants contain predictabel concentration of essential elements (Campbell and Plank, <http://www.ncagr.com>). This methods could identify accurately the concentration of essential element in plants that is considered as deficient, but the amount of fertilizer that has to be added is remain unclear. For example, according to Gastal and Lemaire (2002), nitrogen uptake rate of field grown crops is regulated not only by soil availability but also by crop growth. The authors subsequently

concluded that the regulation of N uptake under condition of heterogeneous soil N conditions is an area of future research.

Studies reported in this paper describe sucrose diagnostik test which related the amount of fertilizer added to the production of sucrose in Vanilla plants. This study found that addition of 2.2 g TSP, 18.5 g Urea and 9.6 g KCl increase sucrose concentration for up to 4.9, 2.5 and 2.1 fold, accordingly. Since photosynthetic rate depend on the amount of nutrient available (Sawada et al. 1982, Terry and Ulrich 1973) and sucrose is the principle of photosynthate translocated in plants (Ziegler 1975), it is concluded that sucrose diagnostik test could be an efficient method for identifying a proper nutrient supplement.

MATERIALS AND METHODS

Application of fertilizer and harvesting of Vanilla cutting vines for transplantations

More than 5 years old of Vanilla plants, that grown in multiculture in a plantation, was added 500 g TSP/plants in June 2007. This fertilizer was supplied into soil surround the Vanilla plant, about 1 m in diameter. After 9 days of the applications, Vanilla cutting vines was then harvested about 1 m from the apex (Expt. 1). This 1 m Vanilla cutting vines was then divided in such a way to make some 2 nodes of vanilla cutting vines. These vines were then transplanted into soil growth mediums in a polybags about 0.5 l volumes. This growth medium was collected from the top soil of plantation which is also grown by *Leucena glauca* vegetation. In order to avoid direct exposure by sun light, the

transplanted vanilla vines were then placed on the grown and shaded with telonet. The transplanted vanilla vines is watered, if it necessary, by drip irrigations. Experiment station where this growth experiments was conducted has a relatively high humidity since it is located in a mountainous area near the forest. Vanilla cutting vines as kontrols was also treated in the same ways except that the cutting was harvested from Vanilla plants without fertilizer. This experiment was performed in 12 replicates, i.e. 12 TSP and kontrol vanilla cutting vines. Another experiments, was performed in the same way like that in experiment 1, except that Vanilla cutting vines was harvested 8 days after a similar doses of TSP was previously supplied (Expt. 2). This experiment was also conducted in June 2007.

Further experiments (Expt. 3 and 4) were then performed and involving 3 kind of fertilizer, i.e. Urea, TSP and KCL. In experiment 3, the amount of fertilizer supplied was a standard dose i.e. 9.25 g Urea/plants, 1.1 g TSP/plants and 4.6 g KCl/plants. These fertilizers were supplied into 3 groups of Vanilla plants and each group consisting of 4 plants. Those three fertilizers were supplied in solutions into the base of stump plants where most of Vanilla root is located. One other group of plants was not fertilized as kontrol plants. In these experiments, transplantation of cutting vines was not performed and fertilizer application in this experiment was conducted in May 2008.

Experiment 4 was then conducted in the same way like that in experiment 3, except the amount of fertilizer supplied was doubled into: 18.5 g Urea/plants, 2.2 g TSP/plant and 9.2 g KCl/plants. Applications of these fertilizers were conducted in July 2008.

Extraction of sucrose in the sampels of Vanilla plants

In a various time after the application of fertilizer, Vanilla plants was then sampeld for its sucrose content. The sampling time for experiment 1 and 2 was 80 and 73 days after the fertilizer was supplied, accordingly. For experiment 3, sampels was taken in 3 different sampling times; T0, sampling a few hours after fertilizer applications; T1, sampling time at day 10 after the application and T2, sampling time at day 20 after the fertilizer was applied. In experiment 4, sampels was also taken in 3 different sampling time i.e. T0, sampling a few hour after the application of fertilizer, and T1 is a sampling time at day 11 after the fertilizer was applied and T3 is a sampling time at day 24. The sampels were vanilla cutting vines about 7 nodes from the apex and were extracted using a modification methods previously employed by Foley et al. 1992.

Basically, extraction of sucrose from vanilla cutting vines is performed as follow:
After the harvested sampels were dissected into leaves and internodes, the sampels were then weighed for it fresh weigh. The sampels were then ground in a mortar or divided into smaller pieces before incubated in 100 ml of alcohol 70% for 24 h. After this first 24 h incubation, the sampel was then homogenized in a mortar and incubated for another 24 h. The homogenates was then filtered using conventional cotton and it filtrat was collected in a glass wires. Subsequently, alcohol in the filtrat was evaporated using electric stove or hot plates. The volumes of water soluble residue in the remaining solution were adjusted by addition of water to make 1 g FW/ml solution.

Identification of sucrose content in Vanilla extract qualitatively

Qualitative analysis for sucrose content in Vanilla extracts were conducted using modification of methods that described by Estien Yazid and Lisda Nursanti (2006). 5 ml of Vanilla extract was pipetted into marked test tube before added 5 drops of HCl to hydrolyze sucrose that available in the extract. The extract was then placed on boiling water for 30 minutes. After it was cooled in room temperature, the remaining HCl in the solution was then neutralized using 2% NaOH solution. The neutralized solution was tested using lakmus indikator paper. 5 drops of this hydrolyzed extract were then pipette into another test tube, added 15 drops of Benedict reagent, before placed in boiling water for 5 minutes. Color changes in the extract were then compared with the color of standard authentic sucrose solution where its concentration has already been known. For both experiments 1 and 2, qualitative analysis were then followed by quantitative analysis which were performed in a hospital clinic, Rumah Sakit Harapan Bunda, Denpasar. For experiment 3 and 4, quantitative analysis was performed in Laboratorium MIPA, UNHI using Nelson-Somogyi method described by Estien Yazid and Lisda Nursanti (2006).

Identification of sucrose content in Vanilla extract quantitatively using Nelson-Somogyi methods

1 ml of hydrolyzed extract was pipetted into a marked test tube before 1 ml of equal amount of Nelson A and B mixture were added. The test tube were then placed in boiling water for 20 minutes and then cooled in cold water containing Becker glass until temperature reach about 25°C. 1 ml of arsenomolibdate were then added into the test tube, shake thoroughly with vortex mixer until all component were diluted. 7 ml of

aquades were then added and shake with vortex mixer until the solution is homogen. Absorbances of this solution were then read in a spectrophotometer (Apel PD303) in 540 nm wave length. Sucrose concentration in the extract were then calculated using least-square linear regression in $X=aY+b$ equation where a and b is a Constanta which calculated using 5 standard hydrolyzed authentic sucrose. The concentration of this hydrolyzed sucrose standard was 0.25, 0.5, 0.75 and 1%. By measuring absorbance (Y) in each Vanilla extract, sucrose concentration (X) then can be obtained.

RESULTS

The growth of lateral bud in Vanilla cutting vines

Addition of 500 g TSP/plants, into Vanilla plants that grown in multicultural vegetation, did not increase growth in vanilla cutting vines. The number of vines showing growth was much slower than vanilla vines harvested from kontrol plants. When this growth experiments was terminated at day 71 after transplantation, less than 50% (relative replicates) of the vine showing bud burst. By contrast, vanilla vines of kontrol have already shown more than 80% growth at the termination of observation (Figs. 1). A similar growth rate was also found in experiment 2. In this experiment, whereas TSP vanilla vines showing growth less than 50% (relative to the number of replicates), kontrol vines has shown growth more than 70% (Fig. 2).

Sucrose concentration in the vanilla extracts

Examination of sucrose, based on hydrolyzed sugar, found that Vanilla plants fertilized with high doses of TSP produced a very low sucrose relative to kontrol plants. In experiment 1, internodes sucrose content of TSP plants was only 36% relative to kontrol plants. Similar results were also found in experiment 2, where internodes sucrose content in TSP added plants was only 38% relative kontrol plants (Tab. 1). This evidences suggested that addition of the very high doses of TSP inhibited sucrose biosynthesis in the Vanilla plants.

Unlike experiment 1 and 2, in experiment 3 and 4 Vanilla plants were supplied with much lower doses of TSP fertilizer. In experiment 3, Vanilla plants were supplied only with 1.1 g TSP/plants. Addition of TSP in that low amounts, did not enhance sucrose biosynthesis in the plants. In this experiment, qualitative sucrose content in the internodes of fertilized Vanilla plants was similar or lower than kontrol plants almost in all three harvest time (Tab. 2). This qualitative data was confirmed by quantitative measurement using Nelson Somogyi methods (Tab. 3), i.e. relative kontrol plants; addition of this standard fertilizer does not increase sucrose content significantly. In experiment 4, Vanilla plants were supplied with 2.2 g TSP/plants. In these experiments, relative to the concentration of sucrose found in T0, internodes sucrose content 24 days after the application of the fertilizer was found increased for up to 4.9 fold (Fig.3).

Addition of 4.6 g/plants KCl into Vanilla plants was not affected sucrose concentration (Fig. 4). However, when the Vanilla plants was then added 9.2 g of this fertilizer the sucrose content was increased into 1.1 fold 11 days after the addition and into 2.1 fold 24 days after the fertilizer was added (Fig. 3).

Addition of nitrogen as Urea into vanilla plants that grown in mixed culture with legumes showed an unexpected result. In this plants, addition of 18.5 g Urea/plants increased sucrose content for up to 1.6 fold, 11 days after the addition and 2.5 fold 24 days after addition of the fertilizer (Fig. 3). The increased of sucrose content in Urea added plants is therefore higher than the addition of KCl.

DISCUSSIONS

Based on the amount of hydrolyzed sucrose found in the Vanilla extracts (Tab. 1), the rate of sucrose biosynthesis in Vanilla plants is strongly related to the growth of lateral bud in vanilla cutting vines (Figs 1 and 2). These evidences are in agreement with proposal by Wang and Nobel 1998 that growth is dependent on the rate of sucrose biosynthesis. However, the decreased of sucrose biosynthesis in Vanilla plants after the addition of 500 g TSP/plants (in Expt.1 and 2) is still unclear. It is speculated that the amount was too high and the increased of inorganik phosphate in the light energy harvesting system unfavorable for the system to generate energy required for CO₂ reduction. This situation then resulted in the slower production of sugar and subsequent translocation into internodes.

In order to ascertain the amount of TSP that has to be added to improve sucrose biosynthesis, others experiments were then conducted by addition of 1.1 and 2.2 g TSP/plants (Expt. 3 and 4). As shown by data in Fig. 4, addition of 1.1 g TSP/plants unable to increase sucrose content in the Vanilla extract. However, after the plants were added 2.2 g TSP, sucrose content was increased into 4.9 fold (Fig. 3). This evidences

indicated that sucrose diagnostik test could identify the response of plants to the amount of fertilizer added, similar to Critical nutrient level which refer to the concentration of nutrient in plants and crop productions. However, unlike CNL, in this diagnostik test the respond of plants to the fertilizer addition is represented by sucrose content rather than crop production.

Addition of Urea into Vanilla plants is a special interest. In theory, these Vanilla plants have a very high potential of nitrogen sources because it is grown in mixed culture with legumes. Mineralization of legumes biomass and nitrogen fixation by symbiotic bacteria in the legumes would make nitrogen available in a sufficient amount for the plants to grow as has been examined by Nakhone and Tabatabai (2008).

. However, addition of 18.5 g Urea/plants increased sucrose content for up to 2.5 fold (Fig.3) which indicating that the vanilla plants underwent nitrogen deficiency. Although this diagnostik test is an indirect estimation of nutrient status, it is speculated that mineral nitrogen from legumes residue accumulated in the soil layer located below the root system of vanilla plants. The other possibilities is that Vanilla plants acquired a much higher nitrogen concentration in order to favors optimal sucrose biosynthesis rather than phosphorus. As shown by evidences in fig. 3, addition of 18.2 g Urea/plants increased sucrose content into 2.5 fold, but addition of only 2.2 g TSP/plants increase sucrose content into 4.9 fold.

Similar to the addition of Urea and TSP, the increased of sucrose content after the addition of 9.6 g KCl/plants could also indicating that the plants is being under condition of potassium deficiency. Since root system of Vanilla plants mainly located in the upper

parts of soil layer, potassium mineral originated from mineralization possibly unavailable for the growth of Vanilla.

Under condition of experiment and if data found is correct, sucrose diagnostik test could minimized speculation in supplying nutrient supplement particularly in characterizing the nutrient available for uptake by Vanilla plants. Micronutrient for examples is required by plants in trace amount and could undergoes a run off very easily. Since the changes of the micronutrient concentration could affected growth whether deficient or toxicities, sucrose diagnostik test could possibly be employed in further study to identify micronutrient supplement in vanilla plants.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to thank my colleges and friends in Universitas Hindu Indonesia Denpasar who in various ways has supported and encouraged this works. This reaseach is funded by Indonesian Directorate General of Higher Education and the funding was given to I Gede Ketut Adiputra, contract no.: 215/SP2H/PP/DP2M/III/2007, 29 of march 2007 and no.266/SP2H/PP/DP2M/III/ 2008, 6 of March 2008.

REFERENCES

- Albert B, Bray D, Lewis L, Raff M, Robert K, Watson JD 1983. Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York and London.
- Barneix AJ, Arnoz PA, Guitman, MR. 1992. The regulation of nitrogen accumulation in the grain of wheat plants (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant* .86:609-615.
- Bates TR, Lynch JP. 2000. Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 87:958-963.

- Delden, Av. 2001. Cropping system. Yield and growth components of potato and wheat under organik nitrogen management. *Agronomy Journal* 93:1370-1385.
- Estien Yazid dan Lisda Nursanti 2006. Penuntun Praktikum Biokimia untuk mahasiswa analis. Penerbit ANDI, Yogyakarta.
- Foley ME, Bancal MO, and Nichols MB. 1992. Carbohydrate status in dormant and afterripped excised wild oat embryos. *Physiol. Plant.* 85: 461-466.
- Gastal F and Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* 53(370): 789-799.
- Hong-Yan Liu, Wen-Ning-Sun, Wei-Ai Su, Zang-Cheng Tang 2006. Co-regulation of water channel and potassium channel in rice. *Physiol. Plant.* 128:58-69.
- Kanai S, Ohkura K, Adu-Gyamfi J J, Mohapatra, P K, Nguyen N T, Saneoka H and Fujita K. 2007. Depression of sink activity precedes the inhibition of biomass production in tomato plants subjected to potassium deficiency stress. *Journal of Experimental Botany* 58(11):2917-2928
- Lakitan B. 1993. Dasar-dasar fisiologi tumbuhan. Divisi Buku Perguruan Tinggi, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Nakhone LN, Tabatabai MA. 2008. Nitrogen mineralization of leguminous crops in soils. *Journal of plant nutrition and soil science* Vol. 171: 231-241
- Sawada S, Igarashi T, Miyachi S. 1982. Effect of nutritional level of phosphate on photosynthesis and growth studied with single, rooted leaf of dwarf bean. *Plant and Cell Physiology* Vol 23 No.1: 27-33.
- Sudana M, Suprpta DN, Rai Maya Temaja G. 2007. Organik vegetabel cultivation experiment in Bali. Faculty of Agriculture, Udayana University, Bali.

- Suprpta DN. 2007. Biopesticides to kontrol Plant Pest in Organik Farming System. International Symposium "Utilization of bioagents to develop organik farming system". School for Post graduates Studies, Udayana University. Jl. PB. Sudirman, Denpasar.
- Terry N and Ulrich A. 1973. Effect of phosphorus deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. *Plant physiol* 51: 43-47.
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157(3):423-447.
- Wang N and Nobel PS. 1998. Phloem transport of fructans in the Crassulacean Acid Metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiol.*: 116(2):709-714
- Wilcockson SJ and Abuzeid AE 1991. Growth of axillary buds of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *Bullata* sub var. *Gemmifera*). *Journal of Agricultural science* 117:207-212.
- Ziegler H. 1975. Nature of transported substances. –In *Transport in plants. I. Phloem transport*. *Encyclopedia of Plants Physiology, New series* (M.H. Zimmerman and J.A. Milburn, eds), Vol. 1, pp. 59-100. Springer-Verlag, New York, NY.

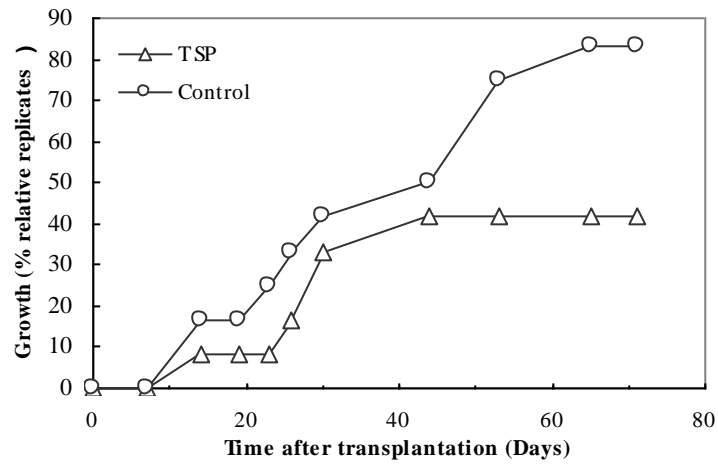


Fig. 1. The growth of lateral bud in Vanilla cutting vines harvested 9 days after the application of 500 g TSP/plants

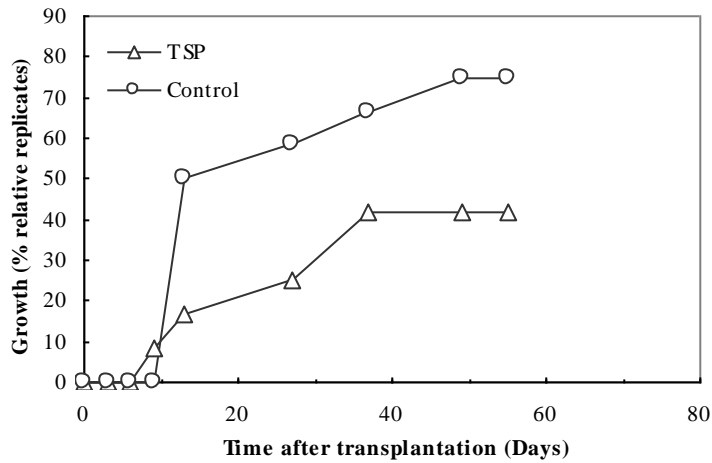


Fig. 2. The growth of lateral bud in Vanilla cutting vines harvested 8 days after the application of 500 g TSP/plants.

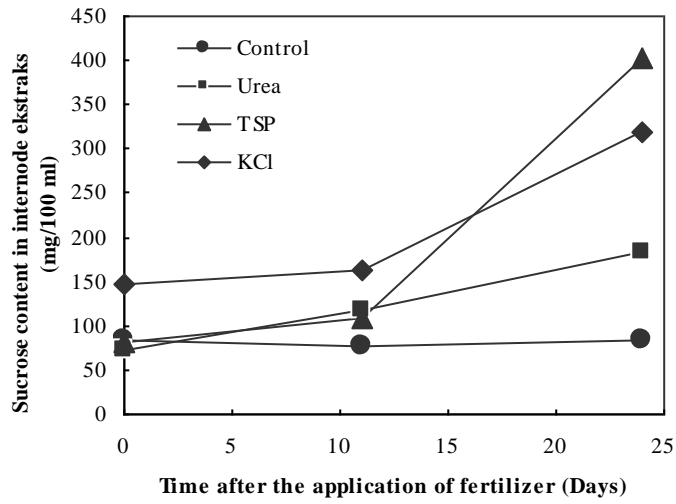


Fig. 3. The changes of sucrose content in the extract of internodes of Vanilla plants after addition of 18.5, 2.2 and 9.2 g/plants Urea, TSP and KCl, respectively.

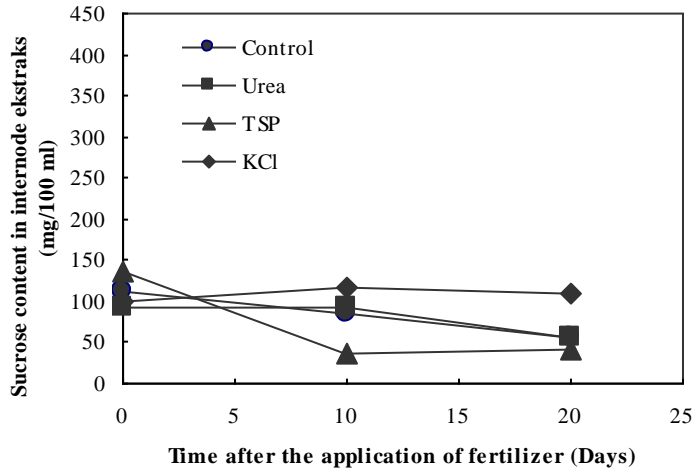


Fig. 4. The changes of sucrose content in the extract of internodes of Vanilla plants after addition of 9.25, 1.1 and 4.6 g/plants Urea, TSP and KCl, respectively.

Tabel 1. Sucrose content in the extract of Vanilla plants harvested 80 and 73 days after the application of 500 g TSP/plants (Expt. 1 and 2).

No	Hydrolyzed glucose content (mg/100ml)			
	Kontrol plants		TSP plants	
	Leaf	Internode	Leaf	Internodes
Expt.1	44.8	49.8	38.0	13.7
Expt.2	58.7	227.4	25.2	84.2

Tabel 2. Qualitative sucrose content in the extract of Vanilla plants after the application of 9.25 g Urea/plants, 1.1 g TSP/plants and 4.6 g KCl/plants. Sucrose concentration was estimated using the colour of standard solution and the concentration is shown as estimated sucrose standard: <<0.5, much less than 0.5% sucrose standard; <0.5, less than 0.5%; ≈0.5, almost similar to 0.5%

Sampel	Water	Kontrol		Urea		TSP		KCl	
		leaf	internodes	leaf	internodes	leaf	internodes	leaf	internodes
T0	0.00	<<0.5	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5
T1	0.00	0.00	<<0.5	0.00	<<0.5	0.00	0.00	0.00	<<0.5
T2	0.00	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	0.00	≈0.5	≈0.5	0.5<

Tabel 3. Sucrose content in Vanilla extract quantitatively ,after the application of 9.25 g Urea/plants, 1.1 g TSP/plants and 4.6 g KCl/plants. This quantitative data was calculated based on hydrolyzed sucrose that measured using Nelson-Somogyi methods.

No	Sampel,E1	Sucrose (mg/100ml)		
		E1T0	E1T1	E1T2
1	Kontrol leaf	98.421	92.214	49.05
2	Kontrol internode	110.847	86.001	56.571
3	Urea leaf	75.531	53.301	55.263
4	Urea internode	92.535	93.195	56.898
5	TSP leaf	79.782	43.818	40.221
6	TSP Internode	136.353	36.951	41.202
7	KCl leaf	50.025	35.97	50.031
8	KCl internode	98.748	117.72	108.564

Tabel 4. Qualitative sucrose content in the extract of Vanilla plants after application of 18.5 g Urea/plant, 2.2 g TSP/plants and 9.2 g KCL/plant. Sucrose concentration was also estimated using the color of standard solution and the concentration is shown as estimated sucrose standard : <<0.5, much less than 0.5% sucrose standard; <0.5, less than 0.5%; ≈0.5, almost similar to 0.5%

Eksp. 2	Estimated Sucrose. Concentration (%)								
	Air	Ekstrak tanaman panili dengan konsentrasi 1 g FW/ml							
		Kontrol		Urea		TSP		KCl	
	Leaf	Internode	Leaf	Internode	Leaf	Internode	Leaf	Internode	
T0	0.00	<0.5	<0.5	0.00	≈0.5	0.00	<<0.5	0.00	<0.5
T1	0.00	0.00	<0.5	<0.5	≈0.5	0.00	<0.5	<0.5	<0.5
T2	0.00	0.00	<0.5	0.00	<<0.5	<<0.5	≈0.5	0.00	≈0.5

Tabel 5. Sucrose content in Vanilla extract quantitatively ,after the application of 18.5 g Urea/plants, 2.2 g TSP/plants and 9.2 g KCl/plants. This quantitative data was calculated based on hydrolyzed sucrose that measured using Nelson-Somogyi methods.

No	Sampel,E2	Sucrose (mg/100ml)		
		E2T0	E2T1	E2T2
1	Kontrol leaf	62.784	115.104	53.628
2	Kontrol internode	83.712	76.845	83.385
3	Urea leaf	52.974	70.959	100.062
4	Urea internode	71.286	117.066	182.466
5	TSP leaf	91.56	55.263	62.784
6	TSP Internode	81.75	107.91	402.864
7	KCl leaf	69.651	31.065	113.142
8	KCl internode	146.169	163.827	318.498

SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Untuk dapat memberikan nutrient supplement yang lebih sesuai terhadap tanaman budidaya termasuk panili (*Vanilla planifolia*), maka uji diagnostik sukrosa perlu dilakukan tidak hanya terhadap unsur hara makro, tetapi juga unsur hara mikro. Unsur hara mikro ini diperlukan diperlukan tumbuhan dalam jumlah yang sangat sedikit. Oleh karena itu, perubahan jumlah yang hanya sedikit sangat mungkin dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman baik karena defisiensi atau karena toksisitas. Hal ini mungkin dapat diandaikan seperti senyawa berkhasiat obat dalam dunia farmasi. Untuk obat yang dosisnya sangat rendah, maka diperlukan perhatian yang lebih serius dalam pemakaiannya, terutama untuk menghindarkan terjadinya over dosis. Hal yang sama mungkin juga berlaku bagi unsur hara mikro pada tanaman. Oleh karena itu, penelitian yang akan dilakukan sebagai kelanjutan dari penelitian tahap II ini adalah uji diagnostik sukrosa terhadap unsur hara mikro pada tanaman panili (*Vanilla planifolia*).