

Kalibrasi nilai SPAD dan kandungan pigmen fotosintesis daun jagung bijian varieti P4546 pada peringkat vegetatif dan reproduktif melalui analisis korelasi dan regresi

(Calibration of SPAD value and leaf photosynthetic pigments concentration in grain corn variety P4546 at vegetative and reproductive stages using correlation and regression analysis)

Muhammad Najib Othman Ghani, Halimah Hashim, Nurhazwani Mustaffer, Faizah Salvana Abd Rahman dan Mashitah Jusoh

Pengenalan

Secara amnya, pigmen adalah molekul yang menyerap cahaya dan mempunyai warna. Tumbuhan mengandungi pelbagai jenis pigmen seperti antosianin, flavonoid, flavine, quinone, cytochrome, klorofil dan karotenoid. Walau bagaimanapun, hanya pigmen klorofil dan karotenoid sahaja yang diklasifikasikan sebagai pigmen fotosintesis memandangkan pigmen tersebut mempunyai keupayaan menyerap cahaya matahari untuk kelangsungan proses fotosintesis iaitu satu proses penukaran tenaga cahaya kepada tenaga biokimia bagi menghasilkan glukosa dan oksigen. Kedua-dua pigmen tersebut sangat banyak terdapat di dalam organel kloroplas. Klorofil adalah pigmen utama di dalam tumbuhan yang menyerap gelombang cahaya spektra biru dan merah serta memantulkan cahaya spektra hijau yang memberikan warna hijau pada tumbuhan.

Pigmen utama klorofil ialah klorofil a dan klorofil b. Klorofil dalam tumbuhan mempunyai fungsi tertentu di mana klorofil a bertindak sebagai pigmen utama menyerap cahaya semasa proses fotosintesis manakala klorofil b pula sekadar mengumpul dan memindahkannya kepada klorofil a. Berbeza dengan klorofil, karotenoid menyerap gelombang cahaya spektra ungu lembayung dan biru-hijau. Hasilnya, bahagian tumbuhan yang mempunyai tinggi pigmen karotenoid akan berwarna kuning dan jingga. Selain menyerap cahaya untuk proses fotosintesis, karotenoid juga dilaporkan berfungsi untuk menyerap tenaga cahaya yang masuk secara berlebihan di dalam kloroplas dan seterusnya menyingkirkan tenaga cahaya tersebut dalam bentuk haba. Kedua-dua pigmen ini adalah sangat penting dalam tumbuhan bagi memastikan kelangsungan proses fotosintesis secara efisien, pertumbuhan berada pada tahap optimum dan seterusnya menjamin hasil tanaman yang tinggi. Penentuan kandungan pigmen fotosintesis boleh dilakukan di dalam makmal secara pengekstrakan pigmen-pigmen tersebut menggunakan pelarut seperti dimetil sulfoksida (DMSO) dan juga aseton. Keamatan larutan pada beberapa jarak gelombang kemudian diukur menggunakan mesin UV-Vis spectrophotometer dan dikira

berdasarkan formula yang telah diterbitkan oleh Hiscox dan Israelstam pada 1979.

Jagung bijian (*Gambar 1*) merupakan tanaman industri berpotensi tinggi digunakan sebagai sumber utama makanan poltri di Malaysia. Satu pendekatan telah diambil oleh MARDI dengan menjalankan projek penanaman jagung bijian di beberapa lokasi seluruh Malaysia bermula pada tahun 2017 melalui inisiatif Sumber Kekayaan Baharu (SKB) bawah dasar keselamatan makanan negara. Selain daripada faktor genetik, pengairan dan cuaca, pertumbuhan jagung bijian sangat bergantung kepada status nutrien terutamanya nitrogen (N) yang perlu dipantau sepanjang penanaman. Memandangkan kandungan klorofil adalah berkadar terus dengan kehijauan daun, pemantauan kehijauan daun pada jagung bijian boleh ditentukan dengan menggunakan alat mudah alih SPAD (*Soil and Plant Analyzer Development*).

Alat mudah alih SPAD berfungsi mengukur pancaran radiasi merah dan inframerah pada jarak gelombang 650 nm dan 940 nm yang melalui helaian daun dan seterusnya mengira dan menukarkannya kepada nilai relatif SPAD. Untuk setiap varieti tanaman, parameter SPAD dan kandungan pigmen fotosintesis perlu dikalibrasi terlebih dahulu untuk menentukan keupayaan alat SPAD dalam menganggar kandungan pigmen fotosintesis. Kalibrasi ini perlu dilakukan pada pelbagai peringkat pertumbuhan; vegetatif dan reproduktif memandangkan hubungan nilai SPAD dan kandungan pigmen fotosintesis bergantung kepada peringkat pertumbuhan. Selain itu, faktor jenis tanah juga boleh mempengaruhi hubungan parameter-parameter ini dan perlu diambil kira dalam kalibrasi SPAD-pigmen fotosintesis.

Melalui analisis korelasi dan regresi antara nilai SPAD dan juga kandungan pigmen fotosintesis yang dianalisis di dalam makmal daripada sampel daun yang sama, hubungan antara dua jenis parameter ini dapat ditentukan. Hubungan ini perlu dinilai kekuatannya berdasarkan *correlation coefficient* (*r*) daripada analisis korelasi dan *determination coefficient* (*r*²) daripada analisis regresi.



Gambar 1. Tanaman jagung bijian

Nilai *r* menunjukkan kekuatan dan arah hubungan (positif atau negatif) hubung kait antara data pada paksi *x* dan *y* dengan penentuan sama ada wujud hubungan yang signifikan atau tidak dilakukan melalui korelasi Pearson. Untuk analisis regresi, nilai *r*² menunjukkan bilangan data paksi *x* (%) yang diterangkan oleh persamaan regresi iaitu model hubung kait antara data pada paksi *x* dan *y*. Jika terdapat hubungan yang signifikan (daripada korelasi Pearson) dan juga nilai *r*² yang tinggi, alat SPAD tersebut dianggap mampu menganggarkan kandungan pigmen fotosintesis dengan ralat yg rendah tanpa perlu melakukan proses pengekstrakan klorofil di makmal yang memerlukan masa yang panjang dan bahan kimia serta alatan yang mahal.

Varieti dan amalan agronomi

Varieti yang digunakan dalam kajian ini adalah hibrid Dupont P4546. Kajian dijalankan di MARDI Serdang, Selangor dengan profil tanah mineral metamorfik (Siri Serdang). Tempoh kajian adalah dari Oktober 2020 sehingga Februari 2021. Sampel daun diambil daripada kajian pembajaan yang melibatkan kadar penggunaan baja N:P:K (15:15:15) dan urea (46% nitrogen) yang berbeza serta hari aplikasi yang berbeza. Ini adalah supaya variasi hubungan SPAD dan pigmen fotosintesis pada status nutrien berbeza (kehijauan daun berbeza) untuk peringkat pertumbuhan vegetatif dan reproduktif dapat dianalisis dengan lebih tepat.

Pengambilan sampel daun

Peringkat vegetatif

Pensampelan dibuat pada hari ke-30 selepas tanam. Proses pensampelan dibuat dengan memilih daun yang terletak paling atas dan telah terbuka sepenuhnya. Sampel kemudiannya diletakkan ke dalam plastik dan dilabel.

Peringkat reproduktif

Pensampelan dibuat pada hari ke-90 selepas ditanam dan sampel daun jagung bijian daripada daun yang terletak paling berhampiran dengan tongkol buah (*Gambar 2*) dipilih untuk pensampelan. Sampel ini dipilih memandangkan daun ini menghasilkan sumber makanan utama untuk tongkol buah. Sampel kemudiannya diletakkan ke dalam plastik dan dilabel.

Penentuan kandungan klorofil relatif (SPAD)

Sampel yang telah diambil dari ladang dibawa terus ke makmal. Permukaan daun jagung dibersihkan daripada sebarang kekotoran dengan menggunakan tisu basah dan kemudiannya dilap menggunakan tisu sehingga kering. Daun kemudian dilipat dua untuk menentukan bahagian tengah. Pada bahagian tengah daun (kiri dan kanan urat utama daun), sensor yang mengeluarkan cahaya pada alat SPAD dihalakan pada bahagian atas daun (*Gambar 3*). Nilai SPAD diambil dengan mengira purata empat bacaan; dua bacaan kanan dan dua bacaan kiri pada bahagian tengah daun.

Pengekstrakan pigmen klorofil a, b dan karatenoid

Pada bahagian yang sama untuk pensampelan nilai SPAD, enam cakera daun; tiga pada kanan dan kiri daun ditebus menggunakan penebuk kertas satu lubang berdiameter 0.6 cm (*Gambar 4*). Keenam-enam cakera daun dipindahkan ke dalam botol kaca yang tidak lut cahaya. Sebanyak 10 mL larutan Dimethyl sulfoksida (DMSO) dimasukkan ke dalam setiap botol. Sampel diletakkan ke dalam ketuhar pada suhu 65 °C selama 4 jam.



Gambar 2. Pemilihan sampel daun untuk peringkat reproduktif



Gambar 3. Pensampelan menggunakan alat SPAD



Gambar 4. Cakera daun yang dihasilkan menggunakan penebuk

Setelah 4 jam, apabila kesemua cakera daun telah luntur warna hijau sepenuhnya (*Gambar 5*), sampel larutan dibiarkan sejuk pada suhu bilik. Sampel larutan kemudian dipindahkan ke dalam cuvette (*Gambar 6*).

Dengan menggunakan mesin UV-Vis *spectrophotometer*, *absorbance*, *A* pada panjang gelombang 480, 510, 649 dan 665 direkodkan. Larutan DMSO diletakkan sebagai sampel kosong (*blank sample*) pada mesin *spectrophotometer*. Kandungan klorofil a, b dan karotenoid dikira dengan memasukkan nilai *absorbance*, *A* pada formula di bawah:

$$\text{Klorofil a (nano mol/cm}^2\text{)} \\ = \frac{[12.47 \times (A665) - 3.62 \times (A649) \times \text{isi padu DMSO, mL} \times 1.119]}{\text{jumlah keluasan daun, cm}^2}$$

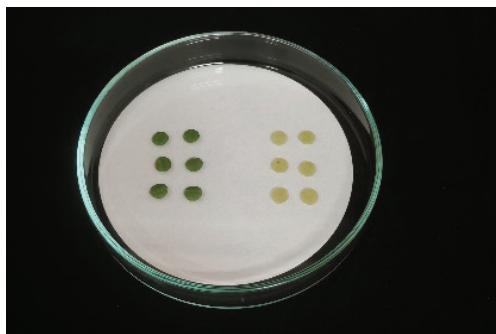
$$\text{Klorofil b (nano mol/cm}^2\text{)} \\ = \frac{[25.06 \times (A649) - 6.5 \times (A665) \times \text{isi padu DMSO, mL} \times 1.102]}{\text{jumlah keluasan daun, cm}^2}$$

$$\text{Karotenoid (nano mol/cm}^2\text{)} \\ = \frac{(7.6 \times A480 - 1.49 \times A510) \times \text{isi padu DMSO, mL} \times 1.102}{\text{jumlah keluasan daun, cm}^2}$$

Hubungan parameter SPAD dan kandungan pigmen fotosintesis pada peringkat vegetatif dan reproduktif

Keputusan daripada 36 set data pada setiap peringkat pertumbuhan menunjukkan korelasi positif yang signifikan melalui analisis Pearson antara nilai SPAD dan kandungan klorofil a, b dan juga karotenoid dengan nilai 0.51 – 0.71 untuk peringkat vegetatif dan 0.87 – 0.91 untuk peringkat reproduktif.

Nilai *determination coefficient* (r^2) walau bagaimanapun adalah lebih rendah pada peringkat vegetatif berbanding dengan peringkat reproduktif. Nilai r^2 pada peringkat vegetatif untuk



Gambar 5. Cakera daun sebelum (kiri) dan selepas (kanan) luntur warna hijau sepenuhnya



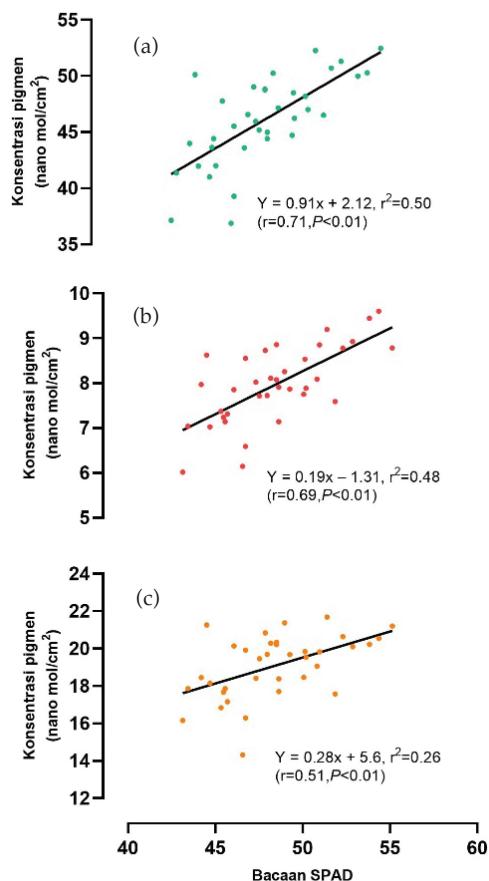
Gambar 6. Sampel larutan yang dipindahkan ke dalam cuvette

pigmen klorofil a, b dan karotenoid masing-masing ialah 0.50, 0.48 dan 0.26 (*Rajah 1*) manakala pada peringkat reproduktif ialah 0.82, 0.75 dan 0.76 (*Rajah 2*).

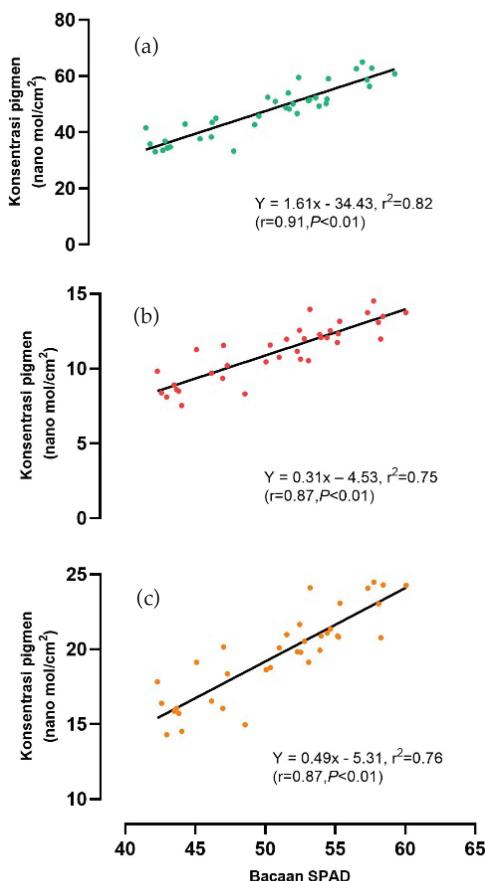
Nilai yang berbeza pada dua peringkat pertumbuhan ini adalah disebabkan pada 30 hari selepas tanam (vegetatif), penghasilan pigmen fotosintesis khususnya karotenoid masih tidak optimum. Alat SPAD tidak dapat menganggarkan kandungan pigmen secara tepat 30 hari selepas tanam dengan ralat sebanyak 50, 52 dan 74% masing-masing untuk pigmen klorofil a, b dan karotenoid. Pada peringkat vegetatif, kajian ulangan yang melibatkan sampel yang lebih besar adalah diperlukan untuk lebih memahami dan menentusahkan hubungan antara nilai SPAD dan pigmen fotosintesis yang diperoleh daripada kajian ini. Ini adalah kritikal memandangkan pada peringkat vegetatif, tanaman jagung bijian yang mengandungi pigmen fotosintesis yang optimum akan menjamin hasil yang tinggi dan berkualiti. Oleh itu, nilai SPAD boleh dijadikan panduan sebagai langkah awal meningkatkan amalan agronomi seperti pembajaan dalam kalangan pengeluar jagung bijian.

Untuk peringkat reproduktif, nilai r yang tinggi (0.87 – 0.91) untuk kesemua pigmen menunjukkan terdapat hubungan positif signifikan yang kuat antara nilai SPAD dan kandungan pigmen fotosintesis. Nilai r^2 antara 0.75 – 0.82 pula menunjukkan 75 – 82% variasi data SPAD diterangkan oleh persamaan regresi iaitu model hubung kait antara SPAD dan pigmen fotosintesis. Dengan ini, persamaan linear yang terhasil untuk pigmen fotosintesis pada peringkat reproduktif adalah seperti dalam *Jadual 1*.

Berdasarkan persamaan linear ini, kalibrasi nilai SPAD dan kandungan klorofil a, b dan karotenoid pada peringkat reproduktif dapat dilakukan dengan mengantikan nilai SPAD pada nilai x. Peratus ketepatan persamaan dalam menganggarkan kandungan klorofil a, b dan karotenoid masing-masing sebanyak 82, 75 dan 76%. Kaedah ini adalah lebih pantas daripada pengekstrakan pigmen fotosintesis di makmal yang memerlukan masa yang panjang di samping bahan kimia yang mahal.



Rajah 1. Korelasi dan regresi antara nilai SPAD dan klorofil a (a), klorofil b (b) dan karotenoid (c) untuk sampel peringkat vegetatif



Rajah 2. Korelasi dan regresi antara nilai SPAD dan klorofil a (a), klorofil b (b) dan karotenoid (c) untuk sampel peringkat reproduktif

Jadual 1. Persamaan linear antara nilai SPAD dan pigmen fotosintesis pada peringkat reproduktif

Kandungan pigmen (n mol/cm ²)	Persamaan linear; x = nilai SPAD, y = pigmen
Klorofil a	$y = 1.61x - 34.43$
Klorofil b	$y = 0.31x - 4.53$
Karotenoid	$y = 0.49x - 5.31$

Kesimpulan

Kalibrasi nilai SPAD dan pigmen fotosintesis (klorofil a, b, karotenoid) pada daun jagung bijian menunjukkan hubungan signifikan yang positif pada kedua-dua peringkat pertumbuhan. Walau bagaimanapun, hubungan ini hanya menghasilkan nilai r^2 yang tinggi pada peringkat reproduktif yang seterusnya membolehkan kandungan pigmen fotosintesis dianggarkan menggunakan nilai SPAD melalui persamaan linear. Kaedah ini tidak memerlukan proses pengekstrakan di makmal, lebih pantas dan murah dalam menilai kandungan pigmen fotosintesis pada daun jagung bijian. Pada peringkat vegetatif, nilai r^2 yang lemah antara nilai SPAD dan pigmen fotosintesis menandakan pigmen fotosintesis tidak dapat dianggarkan dengan tepat berdasarkan nilai SPAD. Kajian ulangan yang melibatkan sampel yang lebih besar diperlukan untuk menentusahkan hubungan antara kedua-dua parameter ini pada peringkat vegetatif.

Bibliografi

- Dwyer, L.M., Tollenaar, M. dan Houwing, L. (1991). A nondestructive method to monitor leaf greenness in corn. *Canadian Journal of Plant Science* 71: 505 – 9
- Hiscox, J.D. dan Israelstam, G.F. (1979) A Method for Extraction of Chlorophyll from Leaf Tissue without Maceration. *Canadian Journal of Botany* 57: 1332 – 1334
- Mohd Yusoff, A., Faridah, M.I. dan Abd malek, K. (2006). Non-destructive determinations of chlorophyll concentration and specific leaf weight using chlorophyll meter during leaf ontogeny in selected fruit species. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 34(2): 219 – 228
- Nor Amna A.M.N, Mohd Rashid, R., Mohd Syauqi, N., Nik Rahimah, N.O., Ahmad Zairy, Z.A, Mohamad Hifzan, R. dan Nurul Huda, S. (2020). The potential of grain corn industry in Malaysia. *Buletin Teknologi MARDI* Bil. 18: 83 – 90
- Snedecor, G.W. dan Cochran, W.G. (1989), Statistical Methods, Eighth Edition, Iowa State University Press
- Szabó, I., Bergantino, E., Giacometti, G.M. (2005). Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *European Molecular Biology Organization Report* 6(7): 629 – 34
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K. dan Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91(1): 37 – 46
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307 – 313

Ringkasan

Jagung bijian merupakan tanaman industri yang berpotensi tinggi sebagai sumber makanan poltri di Malaysia. Tumbesaran jagung bijian sangat bergantung kepada status nutrien terutamanya nitrogen (N) yang perlu dipantau secara berkala. Pemantauan kehijauan daun pada jagung bijian di ladang kebiasaannya dilakukan menggunakan alat khas iaitu *Soil and Plant Analyzer Development* (SPAD). Untuk setiap varieti tanaman yang ditanam, parameter SPAD dan kandungan pigmen fotosintesis perlu dikalibrasi terlebih dahulu untuk menentukan keupayaan alat SPAD dalam menganggar kandungan pigmen fotosintesis. Kalibrasi ini perlu dilakukan pada pelbagai peringkat pertumbuhan; vegetatif dan reproduktif memandangkan kandungan pigmen fotosintesis berbeza pada setiap peringkat pertumbuhan. Melalui analisis korelasi dan regresi antara nilai SPAD dan juga kandungan pigmen fotosintesis yang dianalisis di dalam makmal, hubungan antara dua jenis parameter ini dapat ditentukan. Hubungan ini perlu dinilai kekuatannya berdasarkan *correlation coefficient* (r) dan *determination coefficient* (r^2). Jika terdapat hubungan yang signifikan (daripada korelasi Pearson) dan juga nilai r^2 yang tinggi, alat SPAD tersebut mampu menganggarkan kandungan pigmen fotosintesis dengan ralat yang rendah tanpa perlu melakukan proses pengekstrakan klorofil di makmal yang memerlukan masa yang panjang dan bahan kimia serta alatan yang mahal.

Summary

Grain corn is one of the potential industrial crops in Malaysia for source of poultry feed. The crops' growth is highly dependable on its nutrient status especially nitrogen (N) which needs to be monitored periodically. Monitoring of leaf greenness in the field is usually carried out using SPAD (Soil and Plant Analyzer Development) meter. For each new variety grown, SPAD readings and concentration of photosynthetic pigments need to be calibrated to determine capability of SPAD meter in estimating photosynthetic pigment concentrations. The calibration needs to be done at various growth stages; vegetative and reproductive since concentration of photosynthetic pigments are different at each growth stages. Using correlation and regression analysis between SPAD values and concentration of photosynthetic pigments determined from the lab, relationship between the parameters can be determined. The strength of this relationship can be assessed based on values of correlation coefficient (r) and determination coefficient (r^2). If significant relationship exists (based on Pearson correlation) along with high r^2 value, the SPAD meter is deemed capable in estimating photosynthetic pigments concentrations with low error and without having to carry out extraction procedure in the lab which is destructive, time-consuming and expensive chemicals and instruments.

Pengarang

Muhammad Najib Othman Ghani

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: najibo@mardi.gov.my

Halimah Hashim, Nurhazwani Mustaffer dan Faizah Salvana Abd Rahman

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Mashitah Jusoh

Jabatan Sains Tanaman

Fakulti Pertanian UPM, 43400 Serdang, Selangor