



**RESPON PERTUMBUHAN DAN KANDUNGAN PROTEIN
ANTIOKSIDAN BIBIT MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
SETELAH PEMBERIAN POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)**

SKRIPSI

Oleh

**Y. Nuriyah Alfiyana
NIM 101510501176**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**RESPON PERTUMBUHAN DAN KANDUNGAN PROTEIN
ANTIOKSIDAN BIBIT MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) SETELAH
PEMBERIAN POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)**

SKRIPSI

Diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan
Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi (S1)
Fakultas Pertanian Universitas Jember

oleh

**Y. Nuriyah Alfiyana
NIM 101510501176**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda dan Ibunda, kuhaturkan terima kasih atas segala kasih sayang, dukungan serta do'a yang selalu dipanjatkan yang mungkin tidak dapat terbalas dengan apapun;
2. Kakak-kakak dan adik serta keluarga tercinta, atas motivasi dan dukungan serta do'a yang telah diberikan selama ini;
3. Semua guru-guru sejak Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi yang telah mendidik dan memberikan ilmunya;
4. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“....., niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah mengetahui apa yang kamu kerjakan (58:11)”.

“Barang siapa yang menempuh suatu jalan dalam rangka menuntut ilmu, maka Allah akan memudahkan jalannya menuju surga.”(HR. Muslim).

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan (94:6)”.

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al-Qur'an dan Terjemahnya*. Bandung: Jumanatul 'Ali-ART.

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Y. Nuriyah Alfiyana

NIM : 101510501176

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul **“Respon Pertumbuhan dan Kandungan Protein Antioksidan Bibit Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) setelah Pemberian *Polyethylene Glycol (PEG)*”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 24 Juni 2015

Yang menyatakan,

Y. Nuriyah Alfiyana

NIM 101510501176

SKRIPSI

**RESPON PERTUMBUHAN DAN KANDUNGAN PROTEIN
ANTIOKSIDAN BIBIT MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
SETELAH PEMBERIAN POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)**

oleh

Y. Nuriyah Alfiyana
NIM 10510501176

Pembimbing:

**Dosen Pembimbing Utama : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D.
NIP. 19700810 199803 1 001**

**Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Gatot Subroto, MP
NIP. 19630114 198902 1 001**

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Respon Pertumbuhan dan Kandungan Protein Antioksidan Bibit Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) setelah Pemberian *Polyethylene glycol (PEG)***” telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Rabu, 24 Juni 2015

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember.

DPU,

DPA,

Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D
NIP. 19700810 199803 1 001

Ir. Gatot Subroto, MP
NIP. 19630114 198902 1 001

Penguji,

Dr. Ir. Miswar, M.Si.
NIP. 19641019 199002 1 002

**Mengesahkan
Dekan,**

Dr. Ir. Jani Januar, M.T.
NIP. 19590102 198803 1 002

RINGKASAN

Respon Pertumbuhan dan Kandungan Protein Antioksidan Bibit Melinjo (*Gnetum gnemon L*) setelah Pemberian Polyethylene glycol (PEG); Y. Nuriyah Alfiyana, 101510501176; 2015: 43 halaman; Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Cekaman kekeringan merupakan suatu kondisi di mana kebutuhan air tanaman tidak terpenuhi. Menurut Bray (1997), cekaman kekeringan disebabkan kekurangan suplai air di daerah perakaran. Cekaman kekeringan pada umumnya dapat mempengaruhi aspek fisiologi dan morfologinya. Secara fisiologi tanaman akan mengalami perubahan dalam proses fotosintesisnya karena air yang dibutuhkan saat fotosintesis tidak terpenuhi, selain itu terjadinya cekaman kekeringan akan mengakibatkan terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang dapat memacu terjadinya kerusakan sel tanaman. Untuk mencegah terjadinya kerusakan sel, tanaman melakukan netralisir dengan memproduksi senyawa metabolik antioksidan salah satunya berupa protein antioksidan. Hal ini dilakukan tanaman dalam rangka melakukan adaptasi terhadap stres lingkungan yang berupa cekaman kekeringan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon pertumbuhan dan kandungan protein antioksidan pada bibit melinjo umur 3 bulan setelah pemberian senyawa *Polyethylene Glycol* (PEG) untuk mengkondisikan cekaman kekeringan. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor yaitu konsentrasi PEG berbeda, 0%; 2,5%; 5% dan 10%. Parameter yang diamati pertumbuhan tanaman, kandungan total protein terlarut, aktivitas protein antioksidan dan pola pita protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa parameter pertumbuhan bibit melinjo menunjukkan berbeda tidak nyata dengan pemberian PEG kecuali pada rasio akar tajuk dan kandungan klorofil total, sedangkan Kandungan total protein dan aktivitas antioksidan semakin meningkat sejalan dengan semakin tingginya pemberian konsentrasi PEG, yaitu pada 10% PEG didapatkan kandungan total protein 24,34 mg/g, aktivitas peredaman ABTS 91,16% dengan nilai IC_{50} $2,67 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$). Pola pita protein menunjukkan adanya pola pita berbeda pada perlakuan 10% PEG.

SUMMARY

Growth Response and Antioxidant Protein Content of *Melinjo* (*Gnetum gnemon* L) Seedling after Giving Polyethylene Glycol (PEG); Y. Nuriyah Alfiyana, 101510501176; 2015: 43 pages; Study Program of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Drought (water-stress) in plants is a condition which the water deficit can not fulfill the crop needs. Bray (1997) states that drought stress is caused by lack of water supply in the root area. Generally, drought stress affects physiological and morphological aspect. Crop will face disruption during the photosynthetic process because water supply during photosynthesis can not be fulfilled in physiological response. Further, drought stress will severely causes Reactive Oxygen Species (ROS) which can stimulate cell crops damage. Cell damage will encourage the plant to neutralize by producing metabolic compounds such as antioxidant protein. That is one of the plant's way in order to adaptation against environmental stress such as drought stress.

This research is aimed to determine the growth response and the antioxidant protein content in the melinjo seed after the giving of Polyethylene Glycol (PEG) to overcome drought stress condition. Researcher uses Rancangan Acak Lengkap (RAL) with one factor which has different concentrations of PEG, 0% PEG; 2.5% PEG; 5% PEG and 10% PEG. The parameters observed were plant growth, content of total soluble protein, activity of antioxidant protein and pattern of protein bands. The results of this research showed that the seed growth parameters of melinjo had no significant effect after the giving of PEG except on the crown root ratio and the total chlorophyll content. While, the content of total protein and the activity of antioxidant increased in line with the increasing of PEG concentration giving at 10% PEG obtained content total protein for about 24.34 mg/g. In addition, the ABTS reduction activity was 91.16% with the values of IC_{50} was $2.67 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$. Then, the protein bands pattern showed there was a different pattern on the treatment of 10% PEG.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah yang berjudul ”**Respon Pertumbuhan dan Kandungan Protein Antioksidan Bibit Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) setelah Pemberian Polyethylene Glycol (PEG)**” dengan sebaik-baiknya. Karya Tulis ilmiah ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini tidak terlepas dari bantuan beberapa pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. Ir. Jani Januar, M.T. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember;
2. Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC selaku Ketua Program Studi Agroteknologi;
3. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan dan masukan dalam penyelesaian skripsi ini.
4. Ir. Gatot Subroto, MP. selaku Dosen Pembimbing Anggota, dan Dr. Ir. Miswar, M.Si. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan skripsi ini;
5. Ummi Sholikah, SP., MP. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Orang tuaku tercinta Ayahanda Mustafa dan Ibunda Dahriya beserta saudara-saudaraku yang telah memberikan kasih sayang, dukungan serta doanya hingga sekarang;
7. Teman-teman Penelitian Laboratorium Analisis Tanaman yang telah membantu selama proses pelaksanaan dan penyelesaian skripsi.
8. Teman-teman D-Acid dan sahabat-sahabat terdekat yang telah mebanu dan berjuang bersama untuk menyelesaikan study S1.

9. Teman-teman Program Studi Agroteknologi angkatan 2010 yang bersama berjuang menyelesaikan studi di Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Dengan segala kerendahan hati penulis menyadari bahwa kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT, oleh karena itu penulis senantiasa mengharapkan kritik dan saran dari pembaca. Semoga karya tulis ilmiah ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Jember, 24 Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan dan Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Botani Melinjo dan Penyebarannya	4
2.2 Taksonomi Tanaman Melinjo	4
2.3 Kandungan pada Tanaman Melinjo	5
2.4 <i>Polyethylene Glycol (PEG)</i>	6
2.5 Cekaman Kekeringan	7
2.6 Protein Antioksidan	9
2.7 Metode <i>2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid</i> (ABTS)	11
2.7 Hipotesis	12
BAB 3. METODELOGI	13

3.1 Tempat dan Waktu	13
3.2 Bahan dan Alat	13
3.3 Metode Percobaan	13
3.4 Pelaksanaan Percobaan	14
3.4.1 Pembuatan Media Tanam dan Transplanting	14
3.4.2 Aplikasi Perlakuan	14
3.4.3 Ekstraksi Sampel	14
3.4.4 Penentuan Kandungan Total Protein Terlarut	15
3.4.5 Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode <i>2,2'azinobis-3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid</i> (ABTS)	15
3.4.6 Penentuan Pola Pita Protein dengan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	16
3.4.7 Pengukuran Kandungan Klorofil Total	17
3.4.8 Parameter Pengamatan	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Respon Pertumbuhan Bibit Melinjo terhadap Pemberian PEG.	18
4.2 Kandungan Total Protein Terlarut	23
4.3 Aktivitas Protein Antioksidan	25
4.4 Pola pita protein dengan SDS-PAGE	26
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	29
5.1 Kesimpulan	29
5.2 Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Respon pertumbuhan bibit melinjo terhadap pemberian PEG dengan konsentrasi berbeda	18
Tabel 4.3 Nilai IC ₅₀ (µg /mL) dari sampel daun melinjo dengan pemberian PEG konsentrasi berbeda	25
Tabel 4.4 Perbandingan pita protein hasil SDS-PAGE dari sampel protein daun melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.6 Struktur umum protein	10
Gambar 4.2 Kandungan total protein terlarut bibit melinjo pada konsentrasi PEG yang berbeda	23
Gambar 4.3 Aktivitas protein antioksidan pada bibit melinjo terhadap konsentrasi PEG menggunakan metode ABTS	25
Gambar 4.4 Pola pita protein daun melinjo pada berbagai perlakuan konsentrasi PEG berbeda dengan SDS-PAGE	27

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Tinggi bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG	35
2. Panjang akar bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG	36
3. Rasio akar tajuk bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG	37
4. Berat basah bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG	38
5. Luas daun bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG	39
6. Kandungan klorofil total bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG	40
7. Kandungan total protein terlarut bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG	41
8. Aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi PEG ($\mu\text{g/mL}$)	42
9. Dokumentasi penelitian	43

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan tanaman asli daerah tropika yang meliputi India, Semenanjung Malaysia, Indonesia sampai dengan kepulauan Fiji di lautan Pasifik (Mulyanto, 1994). Tanaman ini dapat tumbuh diberbagai kondisi tanah seperti tanah lempung, berpasir dan kapur, sehingga cocok untuk dibudidayakan dan dikembangkan di Indonesia. Tanaman ini dapat tumbuh pada dataran rendah sampai ketinggian 1.200 m dari permukaan laut. Melinjo dapat dipanen saat berumur 5-7 tahun dan dapat hidup pada umur di atas 100 tahun serta masih tetap dapat menghasilkan buah. Budidaya melinjo belum dilakukan secara intensif hanya sekedar dijadikan tanaman pekarang padahal hampir seluruh bagian tanaman melinjo dapat dimanfaatkan mulai dari batang, daun, bunga, dan buahnya. Masyarakat belum banyak yang menyadari banyak manfaat dari tanaman ini, hanya mengetahui tanaman ini secara tradisional sebagai bahan untuk sayur dan pembuatan emping.

Tanaman melinjo selain memiliki beberapa kandungan gizi yang tinggi juga memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa ini merupakan zat yang mampu memperlambat ataupun mencegah proses oksidasi meskipun konsentrasinya rendah. Senyawa antioksidan dilihat dari sumbernya terbagi menjadi dua yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Semakin berkembangnya zaman antioksidan sintetik mulai ditinggalkan oleh masyarakat karena lebih memilih antioksidan alami yang dianggap lebih baik dan aman. Antioksidan alami banyak diproduksi di dalam tubuh berbagai tanaman salah satunya tanaman melinjo di mana antioksidan tersebut diantaranya berupa protein. Protein merupakan makromolekul yang menyusun lebih dari separuh bagian dari sel. Menurut Siswoyo *et al.* (2011), pada melinjo ditemukan 2 fraksi protein yang memiliki aktivitas antioksidan untuk menangkal radikal bebas, di mana berat molekulnya 30 dan 12 kDa. Sampel yang digunakan penelitian ini berupa daun, di mana daun merupakan pusat dari metabolisme tanaman yang hasilnya ditranslokasikan pada

bagian-bagian tanaman lainnya. Disamping itu untuk mengetahui kandungan protein antioksidan beserta berat molekulnya.

Pertumbuhan tanaman secara umum dapat dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu, faktor biotik dan abiotik. Salah satu faktor abiotik yang dapat mempengaruhi pertumbuhan yaitu cekaman kekeringan. Cekaman kekeringan merupakan suatu kondisi di mana kebutuhan air tanaman tidak terpenuhi. Menurut Bray (1997), cekaman kekeringan disebabkan kekurangan suplai air di daerah perakaran. Cekaman kekeringan pada umumnya dapat mempengaruhi aspek fisiologi dan morfologinya. Secara morfologi tanaman yang mengalami cekaman kekeringan pertumbuhannya akan terbatas, daun menggulung serta menguning dibagian tepi, luas daun mengecil untuk mengurangi terjadinya transpirasi, menurut Fitter dan Hay (1994) bahwa kekurangan air akan mengganggu aktivitas fisiologis maupun morfologis sehingga dapat mengakibatkan terhentinya pertumbuhan dan pada gilirannya tanaman akan mati. Secara fisiologi tanaman akan mengalami gangguan dalam proses fotosintesisnya karena air yang dibutuhkan saat fotosintesis tidak terpenuhi, selain itu terjadinya cekaman kekeringan akan mengakibatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang dapat memacu terjadinya kerusakan sel tanaman. Terjadinya kerusakan sel akan mendorong tanaman untuk menetralsirkannya dengan memproduksi senyawa metabolik salah satunya berupa protein antioksidan. Hal ini dilakukan tanaman dalam rangka melakukan adaptasi terhadap stres lingkungan yang berupa cekaman kekeringan. Menurut Toruan-Mathius (2001), pada tanaman yang diberi cekaman kekeringan akan terinduksi protein baru dengan berat molekul 26-70 kDa dan juga ditemukan 25 kDa yang tidak dapat ditemukan pada tanaman kontrol (tanpa cekaman kekeringan).

Budidaya tanaman melinjo dilakukan guna mendapatkan protein antioksidan yang terkandung di dalamnya. Saat ini dalam melakukan budidaya terdapat beberapa kendala salah satunya masalah kekeringan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh cekaman kekeringan pada tanaman melinjo terhadap pertumbuhan serta peningkatan kandungan protein antioksidan yang terdapat di dalamnya. Perlakuan yang digunakan dalam mengkondisikan cekaman kekeringan yaitu dengan pemberian *Polyethylene glycol* (PEG) pada tanaman di

tahap pembibitan. PEG diharapkan dapat menjadi simulasi yang efektif pada tanaman melinjo terhadap cekaman kekeringan di lapang dan diharapkan PEG ini dapat melihat respon cekaman kekeringan terhadap pertumbuhan serta meningkatkan kandungan protein antioksidan pada tanaman.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian PEG terhadap pertumbuhan bibit melinjo?
2. Bagaimana pengaruh pemberian PEG terhadap kandungan total protein bibit melinjo?
3. Bagaimana pengaruh pemberian PEG terhadap aktivitas protein antioksidan bibit melinjo?

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan

1. Mengetahui pengaruh cekaman kekeringan terhadap pertumbuhan bibit melinjo.
2. Mengetahui pengaruh cekaman kekeringan terhadap tingkat kandungan total protein terlarut bibit tanaman melinjo.
3. Mengetahui aktivitas protein antioksidan pada bibit melinjo yang telah mengalami cekaman kekeringan dengan pemberian PEG.

1.3.2 Manfaat

1. Memperoleh informasi pertumbuhan bibit melinjo yang mengalami cekaman kekeringan.
2. Mempelajari protein antioksidan bibit melinjo dalam melakukan mekanisme pertahanan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Botani Melinjo dan Penyebarannya

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) memiliki sekitar 10 spesies. Di mana tujuh spesies di antaranya tersebar di Amerika Utara dan dua lainnya terdapat di bagian Afrika Barat. Di benua Asia tanaman melinjo banyak tersebar di negara-negara seperti India, China, Malaysia, Indonesia, Filipina dan Fiji (Markgraf, 1951).

Melinjo termasuk golongan tanaman yang berbiji terbuka (*Gymnospermae*). Biji dari tanaman ini tidak dibungkus oleh daging buah tetapi dibungkus oleh kulit luarnya. Menurut Becker dan Van De Brink (1963) dalam Sunanto (1991) menyatakan bahwa di daerah Jawa hanya terdapat satu jenis melinjo yaitu *Gnetum gnemon* L. var *cardo mesticum*. Namun yang terlihat di lapang berbeda dengan pernyataan tersebut di mana melinjo memiliki beberapa variasi dari bentuk tajuk pohon, ukuran buah dan bijinya (Sunanto, 1991).

Melinjo merupakan tanaman asli Indo - Malaya, tergolong keluarga *Gnetaceae*. Ukuran dari pohon melinjo tingginya sekitar 50 kaki dan sering ditemukan di hutan kering dan daerah lembab. Khususnya di Indonesia, penyebaran tanaman ini banyak terdapat di Andaman, Sumatera dan Pulau Jawa. Di Sumatera produktivitas melinjo lebih dari 20.000 butir per tahun. Tanaman ini merupakan spesies tanaman yang tumbuh sendiri di hutan dan umumnya ditanam di pekarangan dan kebun sebagai tanaman pelindung (Parhusip and Sitanggang, 2011).

2.2 Taksonomi Tanaman Melinjo

Tanaman melinjo memiliki beragam nama dari setiap daerah, dalam bahasa sunda melinjo disebut Tangkil. Dalam bahasa Jawa melinjo dikenal dengan sebutan belinjo dan melinjo. Melinjo merupakan spesies tanaman berbiji terbuka (*Gymnospermae*) berbentuk pohon yang berumah dua (*dioecious*, dimana bunga jantan dan betina terletak pada pohon yang berbeda). Tanaman ini masuk pada

family *Gnetaceae* yang terdiri dari satu genus yaitu *Gnetum* dan memiliki lebih dari 30 spesies (Suena *et al.*, 2010).

Tanaman melinjo merupakan tanaman tahunan yang tergolong tanaman berbiji terbuka, di mana pengklasifikasiannya yaitu:

Kingdom : Plantae (tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (menghasilkan biji)
Divisi : Gnetophyta
Kelas : Gnetopsida
Ordo : Gnetales
Famili : Gnetaceae
Genus : *Gnetum*
Spesies : *Gnetum gnemon* L. (Mulyanto, 1994).

Tanaman melinjo memiliki daun berhadapan, berbentuk jorong, urat daun sekunder saling bersambung. Memiliki bunga majemuk yang melingkar di tiap nodus dengan panjang bunga 3-6 cm. Tiap nodus terdapat 5-8 bunga betina yang berbentuk bola. Melinjo memiliki buah yang berbentuk jorong seperti kacang, satu biji dalam satu buah dan kulit tengahnya keras berkayu (Suena *et al.*, 2010).

2.3 Kandungan pada Tanaman Melinjo

Melinjo merupakan tanaman yang memiliki banyak kandungan gizi yang cukup tinggi, mulai dari karbohidrat, lemak, protein, mineral dan vitamin-vitamin (Sunanto, 1991). Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa aktivitas antioksidan tanaman melinjo diperoleh dari total proteinnya yaitu 9-10% dalam setiap biji. Berat molekulnya terbagi menjadi 2 yaitu 30 kDa dan 12 kDa yang efektif dalam mengurangi radikal bebas yang menjadi penyebab berbagai penyakit (Siswoyo *et al.*, 2011).

Melinjo mengandung asam askorbat, tokoferol, dan polifenol memiliki aktivitas sebagai antioksidan juga berpotensi sebagai inhibitor *xantin oksidase*. Proses perebusan meningkatkan aktivitas antioksidannya. Beberapa senyawa antioksidan memiliki potensi sebagai inhibitor xantin oksidase karena mampu

menangkap elektron. Flavonoid golongan flavon dan flavonol memiliki daya inhibisi lebih tinggi daripada golongan flavonoid yang lainnya karena posisi gugus hidroksilnya lebih mudah menangkap elektron dari sisi aktif xantin oksidase. Senyawa lainnya seperti polifenol dan saponin juga berpotensi sebagai inhibitor *xantin oksidase* karena memiliki gugus hidroksil sebagai akseptor elektron dari *xantin oksidase* (Wulandari *et al.*, 2013).

2.4 Polyethylene Glycol

Polyethylene Glycol (PEG) merupakan jenis senyawa yang stabil, non-ionik, memiliki polimer panjang yang larut dalam air dan dapat digunakan dalam sebaran berat molekul yang luas. Stres air atau cekaman kekeringan pada tanaman dengan mengurangi potensial air pada larutan nutrisi tanpa mengakibatkan keracunan. Stres air yang diinduksi oleh PEG di lapang atau di rumah kaca berkorelasi positif dengan yang dilakukan di kultur jaringan. PEG dapat menstimulasi cekaman kekeringan karena sifatnya yang dapat menahan air (Mariska dan Lestari, 2006).

Cekaman kekeringan dapat kita kondisikan dengan memberikan beberapa perlakuan pada tanaman sampel yang akan diteliti. Penggunaan PEG lebih disarankan daripada manitol atau sorbitol karena PEG merupakan stimulan yang paling baik digunakan untuk mengatasi cekaman kekeringan (Verlues *et al.*, 1998). Penggunaan PEG dalam induksi cekaman kekeringan pada tanaman sudah digunakan sejak lama (Krizek, 1985).

PEG 6000 merupakan sejenis senyawa polimer dari *ethylene oxyde* yang dapat digunakan untuk meniru besarnya potensial air tanah atau tingkat cekaman kekeringan. Penurunan potensial air bergantung pada konsentrasi dan bobot molekul PEG yang terlarut dalam air. Larutan PEG 6000 tidak dapat masuk ke dalam jaringan tanaman, sehingga tidak bersifat racun bagi tanaman. Keunggulan sifat tersebut memungkinkan PEG 6000 dapat digunakan sebagai alternatif metode seleksi toleransi genotipe jagung terhadap cekaman kekeringan pada fase perkecambahan dengan memberikan larutan PEG pada media perkecambahan seperti pasir atau kertas (Efendi *et al.*, 2009).

Konsentrasi PEG yang pekat mengakibatkan etilen banyak mengikat air, yang mengakibatkan perkecambahan tanaman akan semakin sulit karena tidak bisa menyerap air sehingga terjadi cekaman kekeringan. PEG 6000 dapat menghambat perkecambahan yang berhubungan dengan stres osmotik. Laju perkecambahan benih dan persentase perkecambahan serta jumlah air yang diabsorpsi benih sangat rendah dengan naiknya tingkat stres osmotik (Afa *et al.*, 2012).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Supriyadi (2014) menyatakan bahwa terdapat adanya peningkatan kandungan protein yang dihasilkan pada kalus biji melinjo dengan adanya induksi konsentrasi PEG yang berbeda, yaitu 0%, 5%, 10% dan 15%. Kandungan protein yang dihasilkan oleh perlakuan kontrol yaitu sebanyak 2,4 mg/g berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi PEG yang lainnya dengan hasil berurutan 3,4 mg/g, 3,6 mg/g, dan 5,5 mg/g. Perbedaan kandungan protein pada perlakuan PEG dengan tingkat konsentrasi yang berbeda disebabkan karena adanya induksi dari PEG sehingga terjadi pembentukan protein pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan.

2.5 Cekaman Kekeringan

Cekaman kekeringan pada tanaman menjelaskan bahwa tanaman mengalami kekurangan air akibat dari keterbatasan air yang diperlukan oleh tanaman dari lingkungannya yang berupa media tanam. Tanaman memiliki mekanisme adaptasi saat mengalami cekaman kekeringan yaitu dengan pengaturan osmotik sel. Pada mekanisme ini akan terjadi sintesis dan akumulasi senyawa organik yang dapat menurunkan potensial osmotik sehingga menurunkan potensial air dalam sel tanpa membatasi fungsi enzim serta menjaga turgor sel. Senyawa-senyawa yang berperan dalam penyesuaian osmotik ini antara lain gula osmotik, prolin dan betain, protein dehidrin, dan asam absisik (ABA) yang berperan memacu akumulasi senyawa tersebut (Thoruan-Mathius *et al.*, 2001).

Cekaman kekeringan mempengaruhi membran sel yang menyebabkan turgor menurun dan selanjutnya menahan laju pembesaran sel. Tanaman yang tercekam air berkepanjangan mengakibatkan laju pertumbuhan terhambat

sehingga ukuran dan produksi lebih rendah dibandingkan dengan yang normal (Kramer, 1983).

Cekaman kekeringan akan mengakibatkan penurunan dalam pembentukan dan perluasan daun, meningkatnya penuaan dan perontokan daun. Perluasan daun lebih peka terhadap cekaman kekeringan dari pada penutupan stomata. Meningkatannya penuaan daun cenderung terjadi pada daun-daun yang lebih bawah yang kurang aktif dalam fotosintesis dan dalam penyediaan asimilat, sehingga kecil pengaruhnya terhadap hasil (Goldsworthy dan Fisher, 1992)

Sabehat *et al.* (1998), menyatakan bahwa ditemukan adanya akumulasi protein dengan bobot molekul rendah apabila suatu tanaman mengalami cekaman kekeringan. Respon tanaman yang mengalami kekeringan meliputi perubahan pada tingkat seluler dan molekuler seperti perubahan akumulasi senyawa metabolit osmotik terlarut, perubahan metabolisme karbon dan nitrogen sebagai respon biokimia, dan perubahan ekspresi gen sebagai respon molekuler (Muller and Whitsitt, 1996).

Menurut Yahya (1998) dalam Jumin (1992), selama perkembangan vegetatif, kekurangan yang bagaimanapun kecilnya dapat mengurangi laju pelebaran daun dan LAI pada tingkat perkembangan berikutnya. Kekurangan air yang parah dapat menyebabkan penutupan stomata yang mengurangi pengambilan CO₂ dan produksi berat kering.

Pada tahap pembibitan tanaman memiliki berbagai macam toleransi terhadap cekaman kekeringan. Dengan diberikannya cekaman kekeringan pada tahap pembibitan akan memberikan peluang untuk mengidentifikasi genotipe toleran terhadap kekeringan. Berbagai macam cara yang dilakukan tanaman dalam menghadapi cekaman kekeringan yaitu dengan membatasi perkembangan luas daun, tetapi akar tetap berkembang untuk mencapai zona yang masih basa dan menutup stomata untuk membatasi transpirasi (Afa *et al.*, 2012).

Cekaman kekeringan juga mengganggu metabolisme nitrogen. Secara umum, cekaman kekeringan menghidrolisis protein dan mengakumulasi asam amino, terutama prolin. Akumulasi prolin dipicu oleh sintesisnya dari glutamat

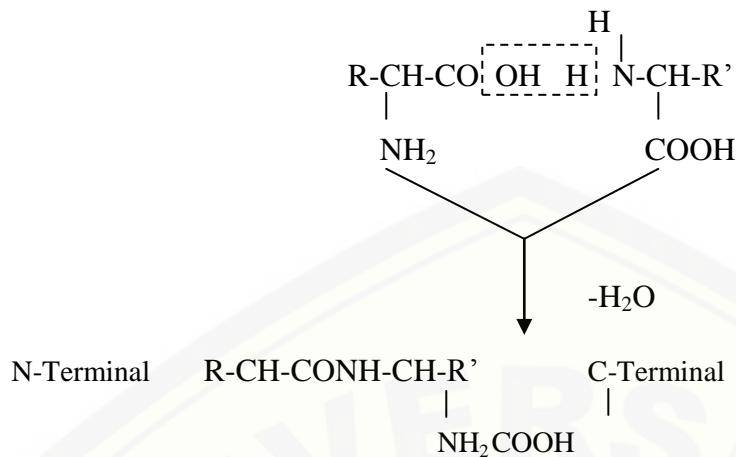
karena hilangnya inhibitor (penghambat) umpan balik, menurunnya oksidasi prolin dan menurunnya penggabungannya menjadi protein (Zulhilmi *et al.*, 2012).

Tanaman jagung yang mengalami stress air selama 10 hari menunjukkan perubahan protein dalam daun yaitu dari 78 protein dari 413 protein menunjukkan variasi kuantitatif yang nyata (meningkat atau menurun), dengan 38 jenis menunjukkan ekspresi yang berbeda dalam 2 genotipe, 11 protein meningkat 1,3-5x pada tanaman stress, dan 8 protein ditemui hanya pada tanaman stress. Protein diketahui berhubungan dengan stress air, sebagai respon terhadap ABA, beberapa enzim berhubungan dengan lintasan metabolis seluler seperti glikolisis dan siklus kreb (Nurhayati *et al.*, 2006).

2.6 Protein Antioksidan

Protein terdiri dari satu atau lebih rantai yang masing-masing rantai terdiri dari ratusan asam amino. Komposisi dan ukuran tiap protein bergantung pada jenis dan jumlah sub unit asam aminonya. Umumnya terdapat 18 sampai 20 jenis asam amino yang berbeda dan sebagian besar protein mempunyai secara lengkap 20 asam amino. Jumlah total sub unit asam amino sangat beragam pada protein yang berbeda sehingga bobot molekul protein juga beragam. Sebagian besar protein tumbuhan yang telah dicirikan mempunyai bobot molekul lebih dari 40.000 g/mol atau disebut dengan satuan dalton. Satu dalton disingkat Da, adalah massa satu atom hidrogen (Salisbury dan Cleon, 1995).

Protein merupakan polipeptida berbobot molekul tinggi yang tersusun atas beberapa asam amino yang bergabung membentuk ikatan peptida (-CONH-). Pemisah antara polipeptida besar dan kecil biasanya berada di antara BM (berat molekul) 8000 dan 10.000. Semua asam amino (kecuali prolin) mempunyai struktur dasar yang sama, yaitu terdiri dari gugus karboksilat (-COOH), gugus amino (-NH₂), gugus R sebagai gugus fungsional (*side chain*) yang menentukan sifat kimiawi protein (Fatchiyah *et al.*, 2011). Struktur umum protein dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Struktur umum protein (Jain, 2005)

Semua sistem kehidupan mengandung sejumlah besar protein yang berbeda. Perbedaannya mungkin terdapat pada susunan amino, urutan asam amino, kandungan non-asam amino, bobot molekul dan pada faktor yang menentukan konformasi protein. Untuk menentukan struktur protein tertentu kita harus memisahkan protein itu dengan bahan non-protein dan dari protein yang lain (Robinson, 1995).

Semua jenis protein terdiri dari rangkaian dan kombinasi dari 20 asam amino. Setiap jenis protein mempunyai jumlah dan urutan asam amino yang khas. Di dalam sel, protein terdapat baik pada membran plasma maupun pada membran internal yang menyusun organel sel seperti mitokondria, retikulum endoplasma, neukleus dan badan golgi dan fungsi yang berbeda-beda tergantung pada tempatnya. Protein-protein yang terlibat dalam reaksi biokimia sebagian besar berupa enzim banyak terdapat di dalam sitoplasma dan sebagian terdapat pada kompartemen dari organel sel (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Fungsi protein di dalam kehidupan biologi terutama tumbuhan yaitu mengkatalisis suatu proses reaksi sebagai enzim. Pada tumbuhan protein terdapat hampir dalam seluruh bagian tubuh tumbuhan. Protein ditemukan pada daun muda dan pada bagian tubuh lainnya seperti polong dan buah. Tumbuhan menyerap unsur-unsur hara yang diperlukan dari dalam tanah melalui akar dan disalurkan keseluruhan bagian tanaman sampai ke daun sehingga tumbuhan

membentuk protein melalui proses perombakan anabolisme dan katabolisme (Sopandi, 2009).

Senyawa antioksidan terdapat dua macam yaitu berupa senyawa alam dan senyawa sintetik. Senyawa antioksidan sintetik telah banyak ditinggalkan karena memiliki sifat karsinogenik, sedangkan antioksidan yang alami mulai dikembangkan dan memiliki peran penting. Senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan alam banyak ditemukan pada tanaman (Lisdawati dan Kardono, 2006).

Antioksidan pada biji melinjo diperoleh dari protein. Jumlah protein pada biji melinjo cukup tinggi hingga 9-10 persen. Protein utamanya didominasi jenis berukuran 30 kDa yang efektif untuk menstabilkan radikal bebas, penyebab berbagai macam penyakit. Antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas merupakan atom molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan (Waji dan Sugrani, 2009).

2.7 Metode 2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)

Metode ABTS menggunakan senyawa 2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid sebagai sumber penghasil radikal bebas. Metode ini menggunakan prinsip inhibisi, yaitu sampel ditambahkan pada sistem penghasil radikal bebas dan pengaruh inhibisi terhadap efek radikal bebas diukur untuk menentukan total kapasitas antioksidan dari sampel (Wang *et al*, 2009). Metode ABTS membutuhkan waktu reaksi yang lebih sedikit, lebih stabil dalam buffer dan dapat diamati dalam rentang pH luas yang mempunyai absorbansi spesifik pada panjang gelombang 734 nm (Re *et al*, 2013).

Metode peredaman radikal kation ABTS merupakan metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dari reaksi kimia. ABTS merupakan radikal dengan pusat nitrogen dengan karakteristik warna biru kehijauan yang ketika

tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal yang tidak berwarna. Metode ini berdasarkan penghambatan pembentukan kation radikal ABTS dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 734 nm yang telah ditentukan dengan spektrofotometer (Antolovich *et al.*, 2001).

Besarnya kemampuan peredaman ABTS radikal dinyatakan sebagai persen *scavenging*. Semakin besar nilai persen *scavenging* suatu senyawa/fraksi menunjukkan besarnya kemampuan senyawa tersebut dalam menangkap suatu radikal bebas. Pengukuran IC₅₀ dilakukan dengan algoritma regresi nonlinear dari besar persen *scavenging*, dimana nilai IC₅₀ menunjukkan besar konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas sebanyak 50%.

$$\text{Persen Inhibisi} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{control}}} \times 100\%$$

Dimana A_{control} merupakan besar absorbansi tanpa sampel dan A_{sampel} merupakan besar absorbansi sampel dengan konsentrasi tertentu (Arnao, 2000).

2.8 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang, tujuan dan pustaka dapat dihipotesiskan bahwa:

1. Pemberian cekaman kekeringan dengan PEG berpengaruh terhadap pertumbuhan bibit melinjo.
2. Pemberian cekaman kekeringan dengan PEG dapat meningkatkan kandungan total protein pada bibit melinjo.
3. Pemberian cekaman kekeringan dengan PEG dapat meningkatkan aktivitas protein antioksidan pada bibit melinjo.

BAB 3. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian tentang Respon Pertumbuhan dan Kandungan Protein Antioksidan Bibit Melinjo (*Gnetum gnemon*) setelah Pemberian *Polyethylene glycol* (PEG) dilaksanakan di Agroteknopark dan Laboratorium Analisis Tanaman Jurusan Budidaya Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jember, mulai bulan Agustus 2014 sampai dengan selesai.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan – bahan yang digunakan dalam percobaan ini antara lain: bibit tanaman melinjo umur 1 bulan, media tanam (pasir, tanah dan pupuk kandang) dengan perbandingan 1:1:1, aquades, PEG-6000, larutan penguji Bradford, buffer fosphat, *Sodium Dodecyl Sulfate Solution* (SDS), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Bovine Serum Albumin* (BSA), *2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid* (ABTS).

Alat – alat yang digunakan polybag 10 x 15 cm, timbangan, gelas ukur, sentrifuge TOMY MRX-150, spektrofotometer MAPADA V-1100D, elektroforosis, pH meter dan alat penunjang lain.

3.3 Metode Percobaan

Percobaan ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap dengan faktor tunggal yaitu konsentrasi PEG, 4 taraf dengan 5 ulangan.

T0 = 0 % PEG (kontrol)

T1 = 2,5 % PEG

T2 = 5 % PEG

T3 = 10 % PEG

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan ANOVA dan jika menunjukkan berbeda nyata maka dilakukan uji Duncan dengan taraf 5%.

Berdasarkan metode percobaan yang dilakukan didapatkan 20 satuan percobaan dengan tata letak di bawah ini :

T3R2	T2R5	T2R1	T0R1
T1R5	T0R2	T1R1	T1R4
T3R3	T2R4	T2R3	T0R4
T0R5	T1R2	T3R1	T1R3
T2R2	T3R4	T0R3	T3R5

3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1 Pembuatan Media Tanam dan Transplanting

Media tanam yang akan digunakan pada tanaman melinjo berupa pasir, tanah, dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1:1 dimasukkan pada polibag 10 x 15 cm. Bibit tanaman melinjo yang digunakan berasal dari koleksi laboratorium. Bibit tanaman yang digunakan berumur 1 bulan yakni memiliki 2 lembar (satu pasang) daun, lalu di transplanting ke media tanam tersebut dan dilakukan pemeliharaan dan perawatan sampai bibit tanaman melinjo memiliki 6 lembar (3 pasang) daun (umur 3 bulan).

3.4.2 Aplikasi Perlakuan

Perlakuan dilakukan saat bibit tanaman melinjo berumur 3 bulan dengan pemberian PEG yang berbeda konsentrasi. PEG dilarutkan dalam aquadest sesuai konsentrasi yang ditentukan. Aplikasi PEG pada bibit tanaman melinjo diberikan selama satu bulan.

3.4.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi bahan dilakukan dengan menimbang sampel seberat 0,1 g lalu digerus menggunakan mortal stumpler yang ditambahkan pasir kuarsa agar mudah halus. Tambahkan buffer phosphate setelah sampel halus dengan perbandingan 1:5. Hasil ekstrak tersebut kemudian dimasukkan kedalam mikrotube untuk disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang

dihasilkan kemudian disimpan untuk analisis kandungan protein, pola protein dan aktivitas protein antioksidannya.

3.4.4 Penentuan Total Protein Terlarut

Kandungan protein yang terdapat dalam sampel dapat ditentukan dengan metode yang dikemukakan oleh Bradford (1976). Sampel yang telah diekstrak diambil sebanyak 5 μL ditambahkan 45 μL aquadest dan 950 μL larutan Bradford kemudian diinkubasi selama 15 menit. Nilai absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Hasil yang didapat dibandingkan dengan standar Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar untuk penentuan konsentrasi total protein terlarut dengan satuan mg BSA/gr berat basah sampel.

3.4.5 Penentuan Aktivitas Protein Antioksidan dengan metode ABTS

Uji peredaman radikal ABTS sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh You *et al* (2002). Reagen ABTS (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*) dipersiapkan dengan mencampurkan 7 mM ABTS dan 2,45 mM *potassium per sulfate* dengan jumlah sebanding yang kemudian diinkubasikan selama 12-16 jam di tempat gelap pada suhu ruang. Sebelum memulai pengujian, reagen ABTS dilarutkan dengan 0,2 M PBS (*phosphate buffer saline*) pH 7,4 hingga besar absorbansi $0,70 \pm 0,02$ pada λ 734 nm. Sampel untuk uji peredaman ABTS radikal dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Untuk kontrol blanko dibuat dengan cara yang sama tanpa penambahan sampel. Campuran sampel dan reagen ABTS dihomogenisasi dengan vortex selama 30 detik dan diinkubasi pada ruang gelap selama 6 menit. Uji peredaman ABTS radikal dinyatakan sebagai persen (%) penghambatan terhadap radikal ABTS. Persen penghitungan dihitung sesuai rumus :

$$\text{Peredaman ABTS (\%)} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100\%$$

Dimana $A_{control}$ merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel (standar) dan A_{sampel} adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel. Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan algoritma regresi nonlinear dari besar persen *scavenging*.

3.4.6 Penentuan Profil Protein Tanaman dengan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Analisa pola protein dilakukan dengan metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) yang merupakan metode pemisahan protein berdasarkan perbedaan berat molekulnya (Bintang, 2010) dilakukan sesuai dengan metode Laemmli (1970). Langkah Pertama dilakukan pembuatan gel dengan konsentrasi 15% akrilamide, elektroforesis protein membutuhkan 2 jenis gel elektroforesis, yaitu *upper gel* dan *lower gel*. Selanjutnya menyiapkan alat elektroforesis yang akan digunakan. Sebanyak 20 μ l sampel protein ditambah dengan 20 μ l buffer loading (95% buffer loading ditambah 5% β -2-mercaptoethanol) kemudian didenaturasi pada suhu 100 °C selama 5 menit. Untuk marker, diambil 5 μ l dimasukkan kedalam sumuran pada gel. Marker protein berfungsi untuk mempermudah penandaan berat molekul protein sampel. Untuk sampel kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel masing-masing sebanyak 40 μ l dan di running pada 30 mA kurang lebih selama 1 jam atau hingga sample mencapai batas atas lower gel dan kemudian menaikkan hingga 60 mA dan sample yang dimasukkan tertarik kebawah hingga sample berada pada gel bagian bawah akan tetapi tidak sampai lepas dari gel. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan melepas gel dari rangkaian plat dan melakukan pewarnaan dengan melakukan perendaman gel hasil elektroforesis dalam larutan 0,10% *coosamassie brilliant blue*. Setelah diwarnai, dilakukan destaining untuk menghilangkan kelebihan warna yaitu dengan merendam gel dalam larutan *destaining* (50 ml aquadest, 40 ml methanol, 10 ml asam asetat glisial) hingga gel menjadi jernih dengan pita terpisah jelas satu sama lainnya. Gel kemudian disimpan dalam 10 % asam asetat glacial selanjutnya dikeringkan. Pita pada gel hasil elektroforesis tersebut didokumentasikan. Pita protein yang terbentuk dalam

gel setelah elektroforesis ditentukan berat molekulnya dengan menggunakan *marker*.

3.4.7 Pengukuran Kadar Klorofil

Pengukuran Kadar klorofil secara spektrofotometrik dilakukan sesuai metode Wintemans dan De Mots (1965), menggunakan pelarut ethanol 96% dan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 649 dan 665 nm. Langkah kerja yang dilakukan adalah menimbang sampel sebanyak 0,1 gram, kemudian digerus dengan pelarut ethanol 96% sampai halus. Hasil ekstraksi di *sentrifuge* dan diambil supernatan kemudian diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 649 dan 665 nm.

* Perhitungan nilai kandungan klorofil adalah dengan rumus:

$$\text{Klorofil total} : (20,0 \times \text{Abs } 649) + (6,1 \text{ Abs } 665) \text{ (mg/L)}$$

3.5 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi:

1. Persentase pertambahan Tinggi tanaman
2. Panjang akar (cm)
3. Rasio akar/tajuk
4. Berat basah (g)
5. Luas daun (cm²)
6. Kandungan klorofil total (mg/L).
7. Total protein terlarut (mg BSA/g)
8. Aktivitas protein antioksidan
9. Pola pita protein

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Respon Pertumbuhan Bibit Melinjo terhadap Pemberian PEG

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan ANOVA rancangan acak lengkap faktor tunggal yaitu konsentrasi Polyethylene glycol (PEG) dengan 4 taraf yakni kontrol (0% PEG), 2,5% PEG, 5% PEG dan 10% PEG. Masing – masing taraf perlakuan menggunakan 5 ulangan. Apabila pada data yang dianalisis menggunakan ANOVA menunjukkan berbeda nyata maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan 5%. Hasil dari parameter pertumbuhan dapat dilihat pada Tabel 4.1 di bawah ini.

Tabel 4.1 Respon pertumbuhan bibit melinjo terhadap pemberian PEG dengan konsentrasi berbeda.

Parameter	Konsentrasi Pemberian PEG			
	0%	2,5%	5%	10%
Persentase Pertambahan Tinggi	12,39a	10,93a	7,98a	4,85a
Panjang Akar (cm)	13,02a	14,44a	14,96a	15,64a
Rasio Akar/Tajuk	0,54a	1,05b	1,12b	1,32b
Berat Basah (g)	5,05a	4,74a	4,32a	4,16a
Luas Daun (cm ²)	16,09a	15,28a	14,86a	14,46a
Kandungan Klorofil Total (mg/L)	10,69d	7,93c	7,07b	6,02a
Total Protein Terlarut (mg/g)	10,17a	13,26b	21,99c	24,34d

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap baris yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%.

Pemberian larutan PEG dengan konsentrasi berbeda pada bibit tanaman melinjo setelah dianalisis menggunakan ANOVA pada beberapa parameter menunjukkan hasil berbeda tidak nyata, kecuali pada parameter rasio akar/tajuk dan kandungan klorofil total yang menunjukkan berbeda nyata. Pada Tabel 4.1 hasil yang didapat dari setiap perlakuan di mana persentase pertambahan tinggi tanaman, luas daun, berat basah dan kandungan total klorofil nilainya semakin turun sejalan dengan meningkatnya pemberian konsentrasi PEG, sedangkan panjang akar tanaman dan rasio akar/tajuk semakin meningkat dengan semakin

ditingkatkannya konsentrasi PEG tersebut. Pemberian PEG pada tanaman akan menyebabkan terjadinya cekaman kekeringan karena tanaman tidak dapat menyerap hara. Hal ini akan menyebabkan terjadinya perubahan morfologi, fisiologi maupun biokimia pada tanaman tersebut.

Persentase penambahan tinggi pada bibit tanaman melinjo yang diberi PEG dengan konsentrasi berbeda pada Tabel 4.1, dimana pada 0% PEG persentase pertambahan tingginya sebesar 12,39; 2,5% PEG sebesar 10,93; 5% PEG sebesar 7,98; dan 10% PEG sebesar 4,85. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa semakin tinggi pemberian konsentrasi PEG menurunkan persentase pertambahan tinggi pada bibit tanaman melinjo. Pertambahan tinggi merupakan salah satu indikator dari pertumbuhan, dimana pertumbuhan merupakan fungsi tanaman yang paling sensitif terhadap kekurangan air. Tanaman yang kekurangan air umumnya akan memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan tanaman yang tumbuh normal. Hal ini terjadi karena kekurangan air pada tanaman akan mempengaruhi turgor sel sehingga mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan sel (Ai dan Torey, 2013). Menurut Palupi dan Dedywiryanto (2008), pada bibit kelapa sawit cekaman kekeringan menekan pertambahan tinggi, dimana pertambahan tinggi tanaman yang normal lebih besar dari pada yang mengalami cekaman kekeringan.

Ada beberapa faktor yang membuat tanaman mempunyai ketahanan terhadap kekeringan di antaranya: memperluas dan memperdalam perakaran, mengurangi jumlah dan luas daun, dan mempertebal daun (Salisbury dan Ross, 1995). Luas daun pada bibit melinjo yang diberikan cekaman kekeringan dengan PEG pada Tabel 4.1 menunjukkan semakin kecil luas daun saat konsentrasi pemberian PEG ditingkatkan, yaitu perlakuan 0% PEG (kontrol) 16,09 cm², 2,5% PEG 15,28 cm², 5% PEG 14,86 cm² dan 10% PEG 14,46 cm². Dengan ini dapat diketahui bahwa bibit melinjo melakukan penyesuaian dengan lingkungan dengan cara memperkecil luas daun saat tanaman mengalami kekeringan untuk mengurangi terjadinya evapotranspirasi yang dapat mengakibatkan tanaman akan kehilangan air.

Panjang akar merupakan salah satu parameter untuk mengetahui respon tanaman terhadap cekaman kekeringan, dimana pada penelitian ini PEG yang mengakibatkan terjadinya cekaman kekeringan tersebut. Berdasarkan data yang diperoleh pada Tabel 4.1 didapatkan bahwa bibit tanaman melinjo dengan pemberian PEG konsentrasi tinggi memiliki rata-rata perakaran yang lebih panjang dari pada tanaman yang konsentrasi PEG-nya lebih kecil ataupun kontrol, dimana rata-rata panjang akar 0% PEG yaitu 13,02 cm; 2,5% PEG yaitu 14,44 cm; 5% PEG yaitu 14,96 cm; dan 10% PEG yaitu 15,64 cm. Menurut Torey, et al. (2013) bahwa pada saat kekurangan air, kemampuan tanaman untuk mempertahankan pertumbuhan akar sangat penting untuk penyerapan air dan unsur – unsur hara. Adanya pemanjangan akar ke lapisan tanah yang lebih dalam menunjukkan bahwa tanaman tersebut resisten dan dapat dijadikan karakter morfologi akar yang potensial. Herawati dan Setiamihardja (2000) menyatakan bahwa di antara metabolisme tanaman di atas cekaman air ini adalah terjadinya perubahan morfologi dan fisiologi tanaman. Perubahan morfologi yaitu perakaran berkembang lebih cepat, terutama ke arah bawah. Tanaman meningkatkan kemampuan penghisapan air dari lapisan tanah yang lebih dalam sementara transpirasi dari bagian atas tanaman menurun. Nurhayati (2007) menambahkan bahwa tanaman menunjukkan toleransi dengan menciptakan potensial air yang tinggi, yaitu kemampuan tanaman tetap menjaga potensial jaringan dengan meningkatkan penyerapan air atau menekan kehilangan air. Pada mekanisme ini tanaman mempunyai kemampuan untuk meningkatkan sistem perakaran, mengatur stomata, mengurangi absorpsi radiasi surya dengan pembentukan lapisan lilin atau bulu rambut daun yang tebal, dan menurunkan permukaan evapotranspirasi melalui penyempitan daun serta pengurangan luas daun. Jones (1991) mengungkapkan bahwa peningkatan volume dan panjang akar merupakan salah satu mekanisme tanaman untuk mengatasi cekaman kekeringan.

Rasio akar/tajuk merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui bahwa tanaman tersebut toleran apa tidak terhadap cekaman kekeringan. Ratio akar/tajuk diketahui dengan cara perbandingan antara biomass akar terhadap biomass tajuk sehingga nantinya akan didapatkan rasio akar/tajuk.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa rasio akar/tajuk tanaman semakin tinggi dengan semakin ditingkatkan konsentrasi secara berturut-turut dapat dilihat, perlakuan 0% PEG (kontrol) yaitu 0,54; 2,5% PEG yaitu 1,05; 5% PEG yaitu 1,12 dan 10% PEG yaitu 1,32. Rasio akar/tajuk mengindikasikan kemampuan tanaman menyerap air ketika terjadi cekaman kekeringan. Menurut Palupi dan Dedywiryanto (2008) salah satu mekanisme adaptasi tanaman terhadap cekaman kekeringan untuk mempertahankan status air tetap tinggi adalah dengan mengembangkan perakaran, sehingga meningkatkan kemampuan tanaman dalam mengabsorpsi air. Meningkatkan perakaran umumnya diikuti dengan penurunan pertumbuhan tajuk. Tanaman yang lebih mengutamakan pertumbuhan akar daripada tajuknya mempunyai kemampuan lebih baik untuk bertahan pada kondisi kekeringan.

Klorofil merupakan komponen kloroplas yang utama yang tersusun oleh N, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, S dan O. Kandungan klorofil berkorelasi positif dengan laju fotosintesis (Li *et al*, 2006). Berdasarkan data kandungan klorofil total bibit tanaman setelah dianalisis dengan statistik dapat diketahui bahwa pemberian PEG dengan konsentrasi lebih tinggi menurunkan kandungan klorofil total yaitu 0% PEG (kontrol) 10,69 mg/L; 2,5% PEG 7,93 mg/L; 5% PEG 7,07 mg/L; dan 10% PEG 6,02 mg/L. Penurunan kandungan klorofil total dapat disebabkan oleh defisiensi air selama cekaman kekeringan yang memproduksi reactive oxygen species (ROS) seperti H_2O_2 sehingga dapat memicu peroksidasi lipid yang juga mengakibatkan kerusakan klorofil, ditandai dengan perubahan warna hijau pada daun menjadi kekuningan (Kumar *et al*, 2011). Menurut Prihastanti (2010) pembentukan klorofil akan optimal apabila kondisi lingkungan mampu mendukung proses fisiologi, seperti ketersediaan air. Tidak tersedianya air merupakan salah satu cekaman abiotik yang menghambat pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman. Air juga merupakan *reagent* yang penting dalam fotosintesis dan reaksi-reaksi hidrolisis (Nio dan Banyo, 2011). Peranan air yang penting ini menimbulkan konsekuensi bahwa kekurangan air akan mempengaruhi semua proses metabolisme tanaman baik secara langsung atau tidak langsung termasuk sintesis klorofil.

Klorofil adalah pigmen hijau yang ada dalam kloroplastida. Pada umumnya klorofil terdapat pada kloroplas sel-sel mesofil daun, yaitu pada sel-sel parenkim palisade dan atau parenkim bunga karang. Dalam kloroplas, klorofil terdapat pada membran thylakoid grana. Pada tumbuhan tingkat tinggi terdapat dua jenis klorofil yaitu klorofil-a dan klorofil-b. Pada keadaan normal, proporsi klorofil-a jauh lebih banyak daripada klorofil-b. Selain klorofil, pada membran thylakoid juga terdapat pigmen-pigmen lain, baik yang berupa turunan-turunan klorofil-a maupun pigmen lainnya. Molekul klorofil tersusun atas 4 cincin pirol dengan Mg sebagai inti. Pada klorofil terdapat rangkaian yang disebut fitil ($C_{20}H_{39}O$) yang jika terkena air dengan pengaruh enzim klorofilase akan berubah menjadi fitol ($C_{20}H_{39}OH$). Fitol adalah alkohol primer jenuh yang mempunyai daya afinitas yang kuat terhadap O_2 dalam proses reduksi klorofil (Muthalib, 2009).

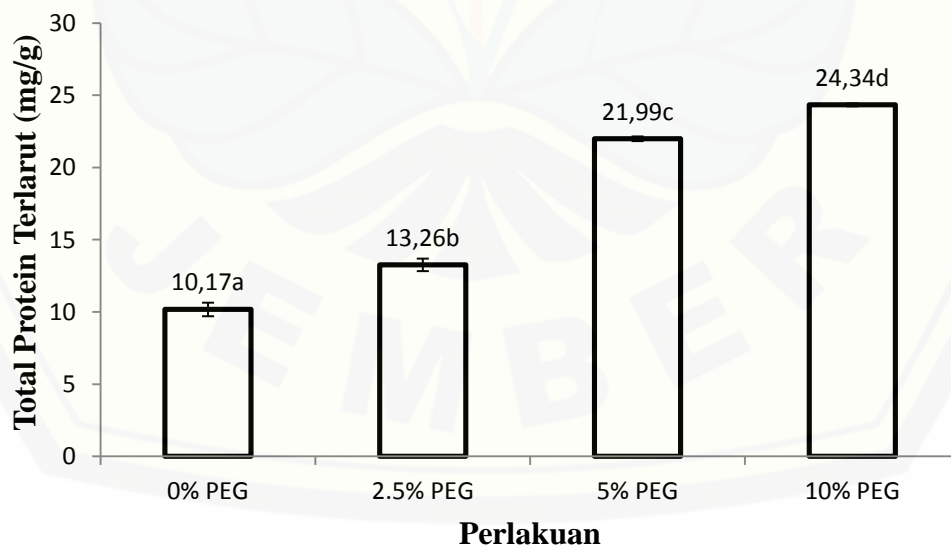
Klorofil disintesis di daun dan berperan untuk menangkap cahaya matahari yang jumlahnya berbeda untuk tiap spesies. Sintesis klorofil dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti cahaya, gula atau karbohidrat, air, temperatur, faktor genetik, unsur-unsur hara seperti N, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, S dan O (Hendriyani dan Setiari, 2009). Kompleks proteinklorofil merupakan komponen fotosintesis yang penting (van der Mescht et al., 1999). Radiasi cahaya yang diterima oleh tanaman dalam fotosintesis diabsorpsi oleh klorofil dan pigmen tambahan yang merupakan kompleks proteinklorofil. Selanjutnya energi radiasi akan ditransfer ke pusat reaksi fotosistem I dan II yang merupakan tempat terjadinya perubahan energi cahaya menjadi energi kimia (Li et al., 2006). Dua mekanisme yang terlibat dalam pembentukan kompleks proteinklorofil adalah distribusi klorofil yang baru disintesis dan redistribusi klorofil yang sudah ada. Klorofil b adalah hasil biosintesis dari klorofil a dan berperan penting dalam reorganisasi fotosistem selama adaptasi terhadap kualitas dan intensitas cahaya. Oleh sebab itu hilangnya klorofil a dan b berpengaruh negatif terhadap efisiensi fotosintesis (van der Mescht et al., 1999).

Penurunan kandungan klorofil pada saat tanaman kekurangan air berkaitan dengan aktivitas perangkat fotosintesis dan menurunkan laju fotosintesis

tanaman. Pembentukan klorofil dihambat dan penurunan enzim rubisco terjadi pada saat tanaman kekurangan. Kekurangan air akan mempengaruhi kandungan dan organisasi klorofil dalam kloroplas pada jaringan. Di samping itu penyerapan unsur hara dari tanah oleh akar terhambat, sehingga mempengaruhi ketersediaan unsur N dan Mg yang berperan penting dalam sintesis klorofil (Nio dan Banyo, 2011).

4.2 Kandungan Total Protein Terlarut

Protein merupakan salah satu senyawa metabolit primer yang dihasilkan oleh tanaman yang peranannya sangat banyak dalam kehidupan. Protein tersusun dari beberapa asam amino sehingga dapat membentuk satu rantai yang panjang. Metode yang digunakan untuk mengetahui kandungan total protein terlarut yaitu dengan uji bradford yang didasarkan pada pengikatan zat warna *commassie brilliant blue G-250* (CBB G-250) terhadap protein. Sampel tersebut selanjutnya diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm untuk mendapatkan kandungan total protein terlarut. Hasil yang didapat dibandingkan dengan standar Bovine Serum Albumin (BSA) (Bradford, 1976).

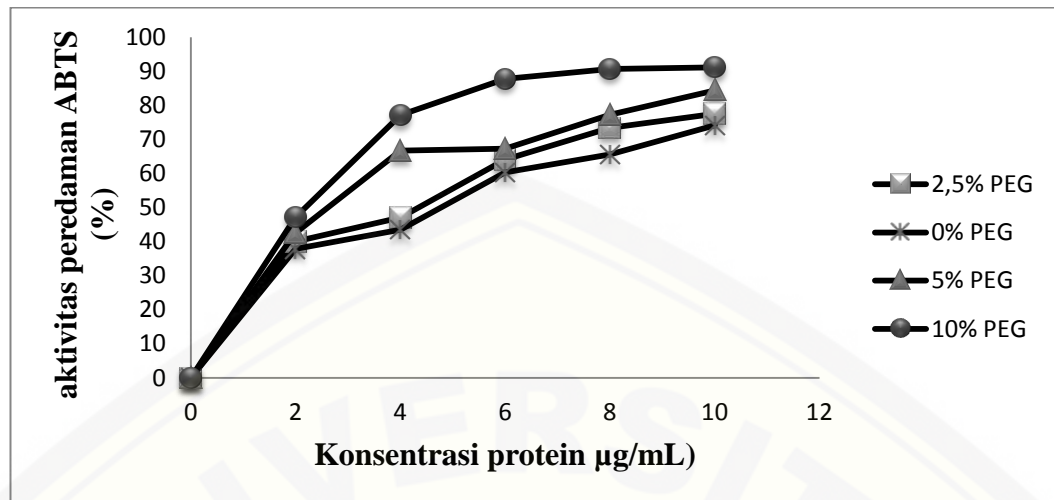


Gambar 4.2 Kandungan total protein terlarut bibit melinjo pada konsentrasi PEG yang berbeda

Berdasarkan Gambar 4.2 bibit tanaman melinjo yang diberi PEG dengan konsentrasi berbeda kandungan total protein terlarut yang dihasilkan yaitu kontrol (0% PEG) dengan total protein terlarut sebesar 10,17 mg/g, 2,5% PEG dengan total protein terlarut sebesar 13,26 mg/g, 5% PEG dengan total protein terlarut sebesar 21,99 mg/g dan 10% PEG dengan total protein terlarut sebesar 24,34 mg/g. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG total protein terlarut yang dihasilkan juga semakin tinggi. Hal ini terjadi karena pemberian PEG dapat mengakibatkan tanaman mengalami cekaman kekeringan dimana tanaman dalam menghadapi cekaman kekeringan dapat melakukan mekanisme osmotik yang diawali dengan perubahan gula osmotik, terutama pada gula silosa yang kemudian terinduksinya protein berbobot molekul rendah (Thoruan-Mathius et al., 2004). Hal ini juga diungkapkan oleh Chkhubianishvili et al. (2011) bahwa dalam menghadapi suatu cekaman tanaman akan melakukan adaptasi dengan melakukan perubahan metabolik yang mengarah ke regulasi enzim antioksidan bersama dengan akumulasi protein pelindung. akan mencoba untuk bertahan saat mengalami cekaman kekeringan dengan melakukan perubahan fisiologi maupun biokomianya. Salah satu cara yang dapat dilakukannya yaitu dengan mengakumulasi kandungan total proteinnya.

4.3 Aktivitas Protein Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron dimana senyawa ini dapat meredam dampak negatif oksidan, termasuk dalam menghambat dan menghentikan kerusakan oksidatif terhadap satu molekul target (Setiawan dan Suhartono, 2005). Senyawa ini dapat berperang apabila memiliki aktivitas untuk membantu dalam meredam suatu senyawa jahat dalam tanaman. Pengujian aktivitas antioksidan antioksidan ini dilakukan dengan menggunakan metode ABTS (*2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazole-6sulfonic acid*), dimana sampel protein yang ingin diketahui aktivitas antioksidannya dianalisis dengan spektrofotometer pada gelombang 734 nm.



Gambar 4.3 Aktivitas protein antioksidan pada bibit melinjo terhadap konsentrasi PEG menggunakan metode ABTS

Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui bibit tanaman melinjo dengan pemberian konsentrasi PEG berbeda dapat meningkatkan aktivitas antioksidannya saat konsentrasi PEG ditingkatkan. Semakin tinggi konsentrasi protein yang diuji aktivitasnya juga semakin tinggi di mana pada konsentrasi 10µg protein yang diuji dengan metode ABTS pada masing – masing perlakuan tingkat peredamannya yakni 0% PEG sebesar 74,09% peredaman, 2,5% PEG sebesar 77,53% peredaman, 5% PEG sebesar 84,34% peredaman dan 10% PEG sebesar 91,16% peredaman. Aktivitas peredaman terhadap radikal ABTS mengindikasikan kemampuan protein untuk mendonorkan elektron ataupun atom hidrogen sehingga memutus reaksi berantai dari radikal bebas, menjadikan senyawa yang lebih stabil dan menurunkan nilai absorbansi (Shimada *et al.*, 1992).

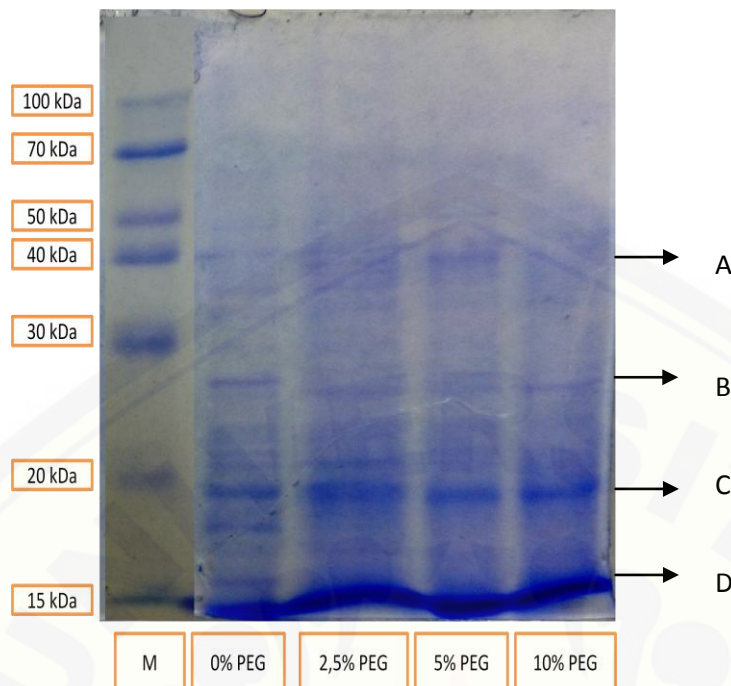
Tabel 4.3 Nilai IC_{50} ((µg/mL) dari sampel dau melinjo dengan pemberian PEG konsentrasi berbeda

Perlakuan	Aktivitas Peredaman (10 µg protein)	Nilai IC_{50} (µg/mL)
0% PEG	74,09%	4,44 ± 0,26
2,5% PEG	77,53%	3,94 ± 0,20
5% PEG	84,34%	3,29 ± 0,08
10% PEG	91,16%	2,67 ± 0,05

Nilai IC_{50} ini digunakan untuk mengetahui seberapa besar konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Berdasarkan Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa nilai IC_{50} pada perlakuan 0% PEG 4,44 $\mu\text{g/mL}$; 2,5% PEG 3,94 $\mu\text{g/mL}$; 5% 3,29 $\mu\text{g/mL}$ dan 10% PEG 2,67 $\mu\text{g/mL}$, dimana dari data tersebut diketahui bahwa kemampuan protein daun bibit melinjo sebagai antioksidan dalam meredam radikal bebas yang efektif adalah pada perlakuan 10% PEG. Pada perlakuan 10% PEG artinya bahwa dengan konsentrasi 2,67 $\mu\text{g/mL}$ protein sudah mampu untuk menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Tanaman yang mengalami cekaman pada perlakuan PEG akan melakukan mekanisme untuk mengatasi cekaman kekeringan salah satunya dengan cara detoksifikasi senyawa oksigen radikal melalui pembentukan protein stress, antara lain protein proteksi, enzim antioksidan, dan protein regulator (Mundree et al, 2002). Hal ini diperkuat oleh Scandalios (1997), bahwa mekanisme yang dilakukan tanaman dalam merespon adanya cekaman kekeringan yaitu dengan cara meningkatkan sintesis antioksidan sebagai perlindungan terhadap kerusakan sel.

4.4 Pola pita protein dengan SDS-PAGE

Analisis pola pita protein dilakukan menggunakan metode Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrilamide Gel Elektroforesis (SDS-PAGE) yang merupakan suatu metode pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya. SDS-PAGE merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Pola pita protein dapat dilihat dari jumlah protein yang diujikan dengan jumlah yang sama yaitu sebesar 31,2 μg . Hasil SDS-PAGE serta perbandingan pita protein pada daun melinjo dengan perlakuan konsentrasi berbeda dapat dilihat pada gambar 4.4.



Keterangan : M (marker), pita protein dengan berat molekul ± 40 kDa (A), ± 28 kDa (B), ± 20 kDa (C), ± 15 kDa (D).

Gambar 4.4 Pola pita protein daun melinjo pada berbagai perlakuan konsentrasi PEG berbeda dengan SDS-PAGE

Tabel 4.4 Perbandingan pita protein hasil SDS-PAGE dari sampel protein daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Protein	0% PEG	2,5% PEG	5% PEG	10% PEG
A	+	+	+	-
B	-	+	+	++
C	+++	+++	+++	+++
D	++	+++	+++	+++

Keterangan : (-) Tidak ada pita
 (+) Ada pita (tidak jelas)
 (++) Ada pita (jelas)
 (+++) Ada pita (sangat jelas)

Berdasarkan gambar hasil SDS-PAGE diatas didapatkan beberapa pita protein. Hasil SDS-PAGE tersebut diambil 4 pola pita untuk dibandingkan antarperlakuan, 4 pola pita yang terbentuk pada hasil SDS-PAGE diatas dapat terlihat pada ketiga perlakuan yaitu pada perlakuan 0% PEG, 2,5% PEG dan 5% PEG sedangkan pada perlakuan 10% PEG tidak terlihat adanya pita A dan pita B

tidak terlihat pada perlakuan 0% PEG . Hal ini terjadi karena pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan yang semakin tinggi memungkinkan tanaman untuk melakukan mekanisme pertahanan dengan memanfaatkan protein antioksidannya. Menurut Thoruan-Mahtius (2004), pada bibit tanaman kelapa sawit yang menyatakan bahwa tanaman yang toleran terhadap cekaman kekeringan melakukan mekanisme penyesuaian osmotik yang diawali dengan perubahan gula osmotik, terutama gula silosa, kemudian terinduksinya protein berbobot molekul rendah. Pada perlakuan 10% PEG memungkinkan protein yang terbentuk lebih dikonsentrasikan pada protein yang berat molekulnya lebih rendah sebagai bentuk pertahanan dari bibit tanaman melinjo yang tercekam kekeringan, dimana hal tersebut dapat dilihat bahwa pada 10% PEG pita C dan D terlihat jelas dari pada pita B dan juga pita A yang bahkan tak terbentuk.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian respon pertumbuhan dan kandungan protein antioksidan bibit tanaman melinjo setelah pemberian PEG dengan konsentrasi berbeda didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian PEG dengan konsentrasi tinggi menyebabkan penurunan pada parameter persentase pertumbuhan tinggi, luas daun, berat basah dan kandungan klorofil total. Sedangkan rasio akar/tajuk dan panjang akar mengalami peningkatan.
2. Kandungan total protein tertinggi didapatkan pada pemberian 10% PEG yaitu 24,34 mg/g.
3. Aktivitas protein antioksidan tertinggi terdapat pada perlakuan 10% PEG yaitu 91.16% dengan nilai IC_{50} paling efektif diantara perlakuan yang lain.

5.2 Saran

Perlu penelitian lanjutan untuk mengetahui kandungan protein antioksidan dan aktivitasnya pada cekaman kekeringan menggunakan PEG dengan konsentrasi yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afa, L. O., B. S. Purwoko, A. Junaedi, O. Haridjaja dan I. S. Dewi. 2012. Pendugaan Toleransi Padi Hibrida terhadap Kekeringan dengan Polyetilen Glikol (PEG) 6000. *J. Agrivigor*, 11: 292-299.
- Ai, N. S. dan Y. Banyo. 2011. Konsentrasi Klorofil daun sebagai Indikator Kekurangan Air pada Tanaman. *Jurnal Ilmiah Sains*, 11: 166-173.
- Ai, N. S. dan P. Torey. 2013. Karakter Morfologi Akar sebagai Indikator Kekurangan Air pada Tanaman. *J. Bios Logos*, 3: 31-39.
- Antolovich, M., Prenzeler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K. 2001. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. 127: 183-198.
- Arnao, MB. 2000. Some Methodological Probles in the Determination of Antoxidant Activity using Chromogen Radical: a Practical Case. *Trends Food Sci. Technol.* 11:419-421.
- Bintang, Maria. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Erlangga, Jakarta.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bray, E.A. 1997. Plant Responces to Water Deficit. *Trends Plant Science*, 2: 48-54.
- Chkhubianishvili, E., N. Kacharava, G. Badridze, S. Chanishvili, and T. Kurdadze. 2011. Activity of Peroxidase, Catalase and Content of Total Protein in Leaves of some Herbaceous Plant of High Mountains of the Caucasus. *Bulletin of The Georgian National Academy of Sciences*, 5: 96-100.
- Efendi, R., Sudarsono, S. Ilyas dan E. Sulistiono. 2009. Seleksi Dini Toleransi Genotipe Jagung terhadap Kekeringan. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 28: 63-68.
- Fatchiyah, E. L. A., Widyarti dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekular*, Prinsip Dasar analisis. Erlangga, Jakarta.
- Fitter, A. H. dan R. K. M. Hay. 1994. *Fisiologi Lingkungan Tanaman*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

- Goldsworthy, P. R. dan N. M. Fisher. 1992. *Fisiologi Tanaman Budidaya Tropik*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Hendriyani, I. S dan N. Setiari. 2009. Kandungan Klorofil dan Pertumbuhan Kacang Panjang (*Vigna sinensis*) pada Tingkat Penyediaan Air yang Berbeda. *J. Sains dan Mat.* 17: 145-150.
- Herawati, T dan R. Setiamihardja, 2000. *Pemuliaan Tanaman Lanjutan*. Program Pengembangan Kemampuan Peneliti Tingkat S1 Non Pemuliaan Dalam Ilmu Dan Teknologi Pemuliaan. Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Jain, V.K. 2005. *Fundamental of Plant Physiology*. S. Chand and Company Ltd, New Delhi.
- Jumin, H. B. 1992. *Ekologi Tanaman Suatu Pendekatan Fisiologi*. Rajawali Press, Jakarta.
- Krizek, D. T. 1985. Methods of inducing water stress in plant. *Hort. Sci.*, 20: 1028-1038.
- Kumar, R.R., Krishna, K., and Naik, G.R. 2011. Effect of Polyethylene Glycol Induced Water Stress on Physiological and Biochemical Response in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.Millsp.). *Plant Research in Science and Technology*, 3: 148-152.
- Li, R., G. Pei-guo, M. Baum, and S. Ceccarelli. 2006. Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators of Drought Tolerance in Barley. *Agricultural Science in China*, 5: 751-757.
- Lisdawati, V. dan L. B. S. Kardono. 2006. Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Media Litbang Kesehatan*, 16: 1-7.
- Mariska, I. dan E. G. Lestari. 2006. Seleksi In Vitro untuk Toleransi terhadap Faktor Abiotik pada Tanaman Padi dan Kedelai. Seminar Nasional Pemanfaatan Bioteknologi untuk Mengatasi Cekaman Abiotik pada Tanaman: 28-41.
- Markgraf. 1951. *Gnetaceae*. Di dalam G.G.J. van Steenis (ed.). *Flora Malesiana*, p. 337. Noordhoff-Kolff N. V., Jakarta.
- Muller, J.E. and M.S. Whitsitt (1996). Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Reg.*, 20:119-124.
- Mulyanto, J. 1994. *Pembibitan dan Budidaya Melinjo*. Kanisius, Yogyakarta.

- Mundree SG, Baker B, Mowla S, Peters S, Marais S, Willigen CV, Govender K, Mareza A, Muyanga S, Farrant JM., and Thomson JA, 2002. Physiological and molecular insight into drought tolerance. *African J. Biotechnol.* 1:28–38.
- Nio, S.A. dan Y. Banyo. 2011. Konsentrasi Klorofil Daun sebagai Indikator Kekurangan Air pada Tanaman. *Jurnal Ilmiah Sains*, 11: 166-173.
- Nurhayati, Rizwan dan Hanifah. 2006. Ekspresi Gen Selama Defisit Air. *J. Penelitian Bidang Ilmu Pertanian*, 4: 18-23.
- Nurhayati. 2007. *Seleksi Mekanisme Toleransi Tanaman Tembakau (Nicotiana tabacum L.) terhadap kekeringan*. [Disertasi]. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Palupi, E. R. dan Y. Dedywiryanto. 2008. Kajian Karakter Ketahanan terhadap Cekaman Kekeringan pada beberapa Genotipe Bibit Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Bul. Agron.*, 36: 24-32.
- Parhusip, A. J. N. and A. B. Sitanggang. 2011. Antimicrobial Activity of Melinjo Seed and Peel Extract (*Gnetum gnemon*) Against Selected Pathogenic Bacteria. *Microbiology Indonesia*, 5: 103-112.
- Prihastanti, Erma. 2010. Kandungan Klorofil dan Pertumbuhan Semai Kakao (*Theobroma cacao* L.) pada Perlakuan Cekaman Kekeringan yang Berbeda. *BIOMA*, 12: 35-39.
- Re, Roberta., Rellegrini, Anna Proteggente, Min Yang, Caterine. 1998. Antioxidant Activity Applying in Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *International Antioxidant Research Center*. Kinga College-Guy's Campus, London.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB, Bandung.
- Sabehat, A., D. W. and S. Lurie .1998. Heatshock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiol Plant.*, 103: 437-441.
- Salisbury, F.,B dan C. W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. ITB, Bandung.
- Scandalios, JG. 1997. *Molecular genetics of superoxide dismutase in plants*. In JG Scandalios, ed, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 527-568.
- Setiawan, B. dan E. Suhartono. 2005. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Maj Kedokteran Indon*, 55: 86-91.

- Shimada, K., Fujikawa K., Yahara K., and Nakamura T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthone on the Auto Oxidation of Soybean in Clycodextrin Emulsion. *J. Agr Food Chem*: 40:945-948
- Siswoyo, T. A., Eka M., Lee K.O and Hosokawa K. 2011. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions from Melinjo (*Gnetum gnemon*) Seed. *Agricultural and Food Chemistry*. 59: 5648-5656.
- Suena, W., I G. N. W. Purwadi dan I A A S. Winayeni. 2010. Pengaruh Konsentrasi Rootone F dan Pupuk Daun Gandasil D terhadap Pertumbuhan Setek Ranting Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *GaneÇ Swara*, 4: 54-58.
- Sunanto, H. 1991. *Budidaya Melinjo dan Usaha Produksi Emping*. Kanisius, Jakarta.
- Supriyadi, A. 2014. *Analisis Protein Antioksidan pada Kalus Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) yang Terinduksi Polyethylene Glycol (PEG)*. Tidak diterbitkan. Skripsi. Program Sarjana Universitas Jember, Jember.
- Thoruan-Mathius, N., G. Wijana, E. Guharja, H. Aswidinnoor, S. Yahya dan Subronto. 2001. Respon tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) terhadap cekaman kekeringan. *Menara Perkebunan*, 69: 29-45.
- Torey, P. C., N. S. Ai, P. Siahaan, dan S. M. Mambu. 2013. Karakter Morfologi Akar sebagai Indikator Kekurangan Air pada Padi Lokal Superwin. *J. Bios Logos*, 3: 57-64.
- Toruan-Mathius, N., T. Liwang, M. I. Danuwikarsa, G. Suryatmana, H. Djajasukanta, D. Saodah dan I. G. P. W. Astika. 2004. Respon Biokimia beberapa Progeni Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) terhadap Cekaman Kekeringan pada Kondisi Lapang. *Menara Perkebunan*. 72: 38-56.
- van der Mescht, A., J. A. de Ronde, F.T. Rossouw. 1999. Chlorophyll Fluorescence and Chlorophyll Content as A Measure of Drought Tolerance in Potato. *South African Journal of Science*, 95:407-412.
- Verlues, P.E., E.S. Obes, and R.E. Sharp. 1998. Root growth and oxygen relation at low water potential. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solution. *Plant Physiol.*, 116: 1403-1412.
- Waji, R.A dan Sugrani, A. 2009. *Kimia Organik Bahan Flafonoid (Quercetin)*. Makalah. Universitas Hasanuddin, Makasar.

- Wang, Wen-Bin, Yun-Hee Kim, Haeng-Soon Lee, Ki-Yong Kim, Xi-Ping Deng, Sang-So Kwak. 2009. Analysis of Antioxidant Enzyme Activity during Germination of Alfafa under Salt and Drought Stress. *Plant Physiology and Biochem.* 47: 550-577.
- Wintermans and De Mots. 1965. Spectrophotometric Characteristics of Chlorophylls a and b and Their Pheophytins in Ethanol. *Biochim Biophys. Acta.* 109: 448-453.
- Wulandari, S. 2013. *Inhibisi Xantin Oksidase oleh Ekstrak Etanol Kulit Melinjo (Gnetum gnemon) Relatif terhadap Allopurinol.* Skripsi. Universitas Negeri Malang, Malang.
- You, Rem, Argly M., Sunxiang, C. and Roome. 2002. Protective Effect of Metallothionein-III on DNA Damage in Response to Reactive Oxygen Species. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1573:33-36.
- Zulhilmi, Suwirnen dan W. R. Surya. 2012. Pertumbuhan dan Uji Kualitatif Kandungan Metabolit Sekunder Kalus Gatang (*Spilanthes acmella* Murr.) dengan Penambahan PEG untuk Menginduksi Cekaman Kekeringan. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 1: 1-8.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tinggi bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	U1	U2	U3	U4	U5		
0% PEG	5,18	5,64	19,04	21,00	11,11	61,97	12,39
2.5% PEG	5,45	13,89	13,00	14,29	8,00	54,63	10,93
5% PEG	3,36	4,24	12,56	15,58	4,16	39,90	7,98
10% PEG	4,70	2,63	8,57	3,80	4,54	24,24	4,85
Total	18,7	26,4	53,2	54,7	27,8	180,74	

Anova

Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-Hitung	F-Tabel 5%	F-Tabel 1%	Notasi
Perlakuan	3	167,51	55,84	2,08	3,24	5,29	ns
Eror (Galat)	16	429,14	26,82				
Total	19	596,65					

Lampiran 2. Panjang akar bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	U1	U2	U3	U4	U5		
0% PEG	17,8	8,00	11	12	16,30	65,10	13,02
2.5% PEG	20,0	10,60	15,1	15	11,50	72,20	14,44
5% PEG	17,6	9,50	17,7	12	18,00	74,80	14,96
10% PEG	13,0	10,80	14,9	18,5	21,00	78,20	15,64
Total	68,40	38,90	58,70	57,50	66,80	290,30	

Anova

Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F-tabel 5%	F-Tabel 1%	Notasi
Perlakuan	3	18,52	6,17	0,40	3,24	5,29	ns
Error (Galat)	16	249,12	15,57				
Total	19	267,6					

Lampiran 3. Rasio akar tajuk bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	U1	U2	U3	U4	U5		
0% PEG	0,70	0,21	0,62	0,61	1,03	2,14	0,54
2.5% PEG	0,89	1,35	1,08	0,72	1,20	5,24	1,05
5% PEG	1,23	0,92	0,87	1,16	1,40	5,58	1,12
10% PEG	1,11	1,06	1,11	1,62	1,68	6,58	1,32
Total	3,93	3,54	3,68	4,11	4,28	19,54	

Anova

Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F-Tabel 5%	F-Tabel 1%	Notasi
Perlakuan	3	1,20	0,40	5,36	3,24	5,29	*
Error (Galat)	16	1,19	0,07				
Total	19	2,39					

Lampiran 4. Berat basah bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	U1	U2	U3	U4	U5		
0% PEG	5,21	4,25	4,94	6,68	4,15	25,23	5,05
2.5% PEG	5,06	4,12	5,61	5,92	2,98	23,69	4,74
5% PEG	4,45	1,12	5,14	5,95	4,94	21,60	4,32
10% PEG	3,59	2,16	3,61	4,62	6,83	20,81	4,16
Total	18,3	11,7	19,3	23,2	18,9	91,33	

Anova

Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F-tabel 5%	F-Tabel 1%	Notasi
Perlakuan	3	2,42	0,81	0,36	3,24	5,29	ns
Error (Galat)	16	35,82	2,24				
Total	19	38,2					

Lampiran 5. Luas daun bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	U1	U2	U3	U4	U5		
0% PEG	17,73	9,55	19,77	15,68	17,73	80,46	16,09
2.5% PEG	17,05	9,55	17,05	17,73	15,00	76,38	15,28
5% PEG	15,00	18,41	17,73	11,59	11,59	74,32	14,86
10% PEG	10,23	23,18	13,64	9,55	15,68	72,28	14,46
Total	60,01	60,69	68,19	54,55	60,00	303,44	

Anova

Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F-Tabel 5%	F-Tabel 1%	Notasi
Perlakuan	3	7,32	2,44	0,14	3,24	5,29	ns
Error (Galat)	16	269,49	16,84				
Total	19	276,81					

Lampiran 6. Kandungan klorofil total bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG

perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	U1	U2	U3		
0% PEG	10,80	10,61	10,66	32,07	10,69
2.5% PEG	7,76	8,12	7,92	23,79	7,93
5% PEG	6,92	7,26	7,03	21,21	7,07
10% PEG	6,33	5,38	6,35	18,06	6,02
Total	31,80	31,37	31,96	95,13	31,71

Anova

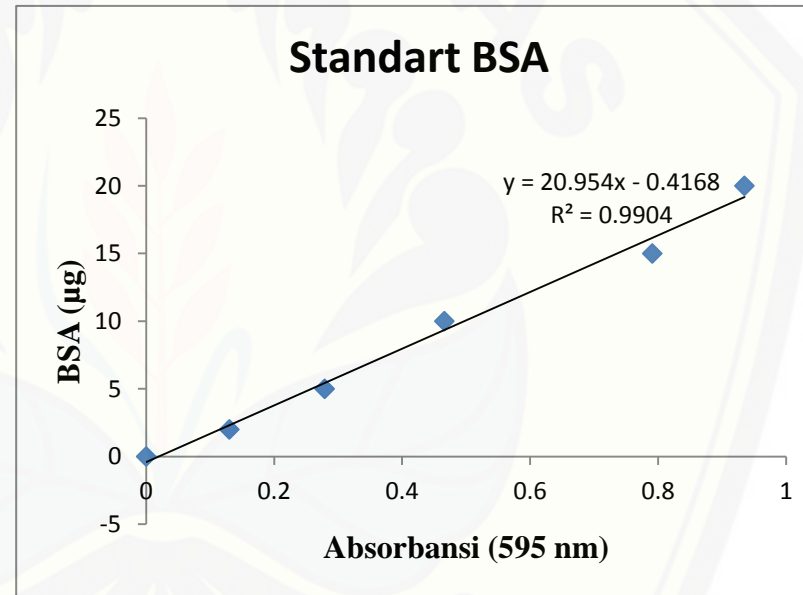
Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	kuadrat Tengah	F Hitung	F - Tabel 5%	F-Tabel 1%	Notasi
Perlakuan	3	36,04	12,01	128,03	4,46	8,65	**
Error (Galat)	8	0,75	0,09				
Total	11	36,79					

Lampiran 7. Kandungan total protein terlarut bibit melinjo pada berbagai perlakuan PEG

Perlakuan	Absorbansi			$\mu\text{g}/\mu\text{l}$			mg/g			Rata-rata
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3	
0% PEG	0,25	0,253	0,285	0,96	0,98	1,11	9,64	9,77	11,11	10,17
2.5% PEG	0,325	0,327	0,357	1,28	1,29	1,41	12,79	12,87	14,13	13,26
5% PEG	0,552	0,539	0,543	2,23	2,18	2,19	22,30	21,75	21,92	21,99
10% PEG	0,604	0,602	0,596	2,45	2,44	2,41	24,48	24,39	24,14	24,34

Standart Bovine Serum Albumin (BSA)

BSA (μg)	Absorbansi (595 nm)
0	0
2	0,13
5	0,279
10	0,466
15	0,791
20	0,935



Lampiran 8. Aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi PEG ($\mu\text{g/mL}$)

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Absorbansi			% Peredaman ABTS			Average
0% PEG	0		0,709		0	0	0	0
	2	0,441	0,419	0,462	37,80	40,90	34,84	37,85
	4	0,426	0,385	0,39	39,92	45,70	44,99	43,54
	6	0,299	0,297	0,248	57,83	58,11	65,02	60,32
	8	0,279	0,243	0,211	60,65	65,73	70,24	65,54
	10	0,227	0,181	0,143	67,98	74,47	79,83	74,09
2,5% PEG	0		0,709		0	0	0	0
	2	0,425	0,417	0,434	40,06	41,18	38,79	40,01
	4	0,414	0,337	0,375	41,61	52,47	47,11	47,06
	6	0,287	0,246	0,231	59,52	65,30	67,42	64,08
	8	0,211	0,2	0,155	70,24	71,79	78,14	73,39
	10	0,198	0,161	0,119	72,07	77,29	83,22	77,53
5% PEG	0		0,709		0	0	0	0
	2	0,41	0,387	0,424	42,17	45,42	40,20	42,60
	4	0,256	0,248	0,225	63,89	65,02	68,27	65,73
	6	0,236	0,215	0,216	66,71	69,68	69,53	68,64
	8	0,182	0,184	0,119	74,33	74,05	83,22	77,20
	10	0,139	0,117	0,077	80,39	83,50	89,14	84,34
2,5% PEG	0		0,709		0	0	0	0
	2	0,374	0,38	0,369	47,25	46,40	47,95	47,20
	4	0,156	0,189	0,142	78,00	73,34	79,97	77,10
	6	0,111	0,081	0,068	84,34	88,58	90,41	87,78
	8	0,094	0,056	0,049	86,74	92,10	93,09	90,64
	10	0,087	0,054	0,047	87,73	92,38	93,37	91,16

Lampiran 9. Dokumentasi penelitian



Populasi bibit melinjo



Pengamatan tinggi tanaman



Pengukuran total protein terlarut



Analisis pola protein dengan SDS-PAGE