



**PENGARUH CEKAMAN GARAM TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
ANTIOKSIDAN PADA DAUN TANAMAN PADI IR64 MELALUI
VARIASI WAKTU PEMBERIAN DAN KONSENTRASI NaCl**

SKRIPSI

Oleh

**Angelia Septaningrum
NIM 131810301025**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**PENGARUH CEKAMAN GARAM TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
ANTIOKSIDAN PADA DAUN TANAMAN PADI IR64 MELALUI
VARIASI WAKTU PEMBERIAN DAN KONSENTRASI NaCl**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Angelia Septaningrum
NIM 131810301025**

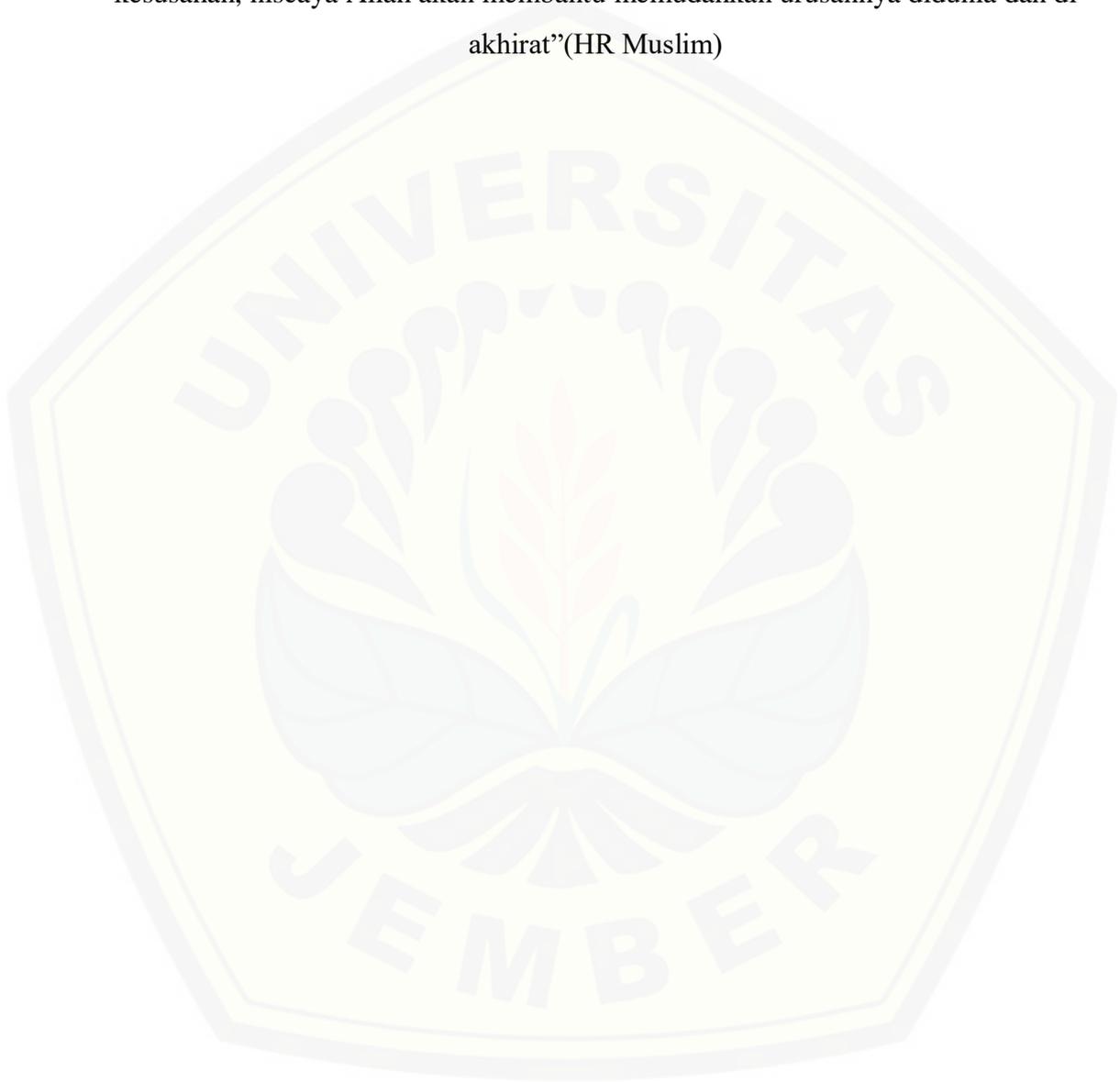
**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2020
PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Almamater tercinta, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Ibunda Marta Maria serta Ayahanda Priyono S.Pd yang senantiasa sabar dan ikhlas memberikan doa, cinta, kasih sayang, nasehat, teladan serta pengorbanan yang tiada henti selama ini
3. Segenap keluarga besar dan saudara-saudara, Pristtama, Nera Yolanda, Abdul Qowait, Shakila, dan Mariyatul Lifa, atas doa, dukungan, nasehat dan motivasi selama ini,
4. Bapak/Ibu guru TK Dharma Wanita, SDN Mojopanggung II, SMP N 1 Giri, SMA N 1 Giri, Bapak/Ibu Dosen Jurusan Kimia, Teknisi Jurusan Kimia, segenap karyawan FMIPA Universitas Jember, Bapak/Ibu Dosen CDAST dan Lab Neutrasetikal dan Farmasetikal, dan Teknisi CDAST yang telah membimbing dan memberikan ilmu, serta pengalamannya;
5. Kawan-kawan Kimia 2013 (TITANIUM), keluarga besar jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember, kawan-kawan di CDAST Lab N&P terimakasih atas semangat, bantuan, saran dan kenangan indah yang telah diberikan;
6. Jamal Husen, terimakasih atas semangat, dukungan, waktu, dan kasih sayang yang telah diberikan tanpa jeda;
7. Feby Valentina dan Wahyu Dian, terimakasih atas bantuan, dukungan yang telah diberikan
8. Teman seperjuangan Titis U., Selvina., Efa U.K., Nanda L., Amalia., Ucil., terimakasih atas doa, motivasi, keceriaan dan kebersamaan selama ini.,
9. Semua pihak yang telah berkontribusi namun tidak dapat disebutkan satu persatu.

MOTTO

“Barangsiapa yang memberikan kemudahan (membantu) kepada orang yang kesusahan, niscaya Allah akan membantu memudahkannya didunia dan di akhirat”(HR Muslim)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Angelia Septaningrum

NIM : 131810301025

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Cekaman Garam Terhadap Aktivitas Enzim Antioksidan Pada Daun Tanaman Padi IR64 Melalui Variasi Waktu Pemberian dan Konsentrasi NaCl” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali apabila dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan merupakan 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik yang berlaku jika ternyata kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Agustus 2020

Yang menyatakan,

Angelia Septaningrum.

NIM 131810301025

SKRIPSI

**PENGARUH CEKAMAN GARAM TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
ANTIOKSIDAN PADA DAUN TANAMAN PADI IR64 MELALUI
VARIASI WAKTU PEMBERIAN DAN KONSENTRASI NaCl**

Oleh

Angelia Septaningrum
NIM 131810301025

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : A.A. Istri Ratnadewi S.Si., M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Ika Oktavianawati S.Si., M.Sc.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “ Pengaruh Cekaman Garam Terhadap Aktivitas Enzim Antioksidan Pada Daun Tanaman Padi IR64 Melalui Variasi Waktu Pemberian dan Konsentrasi NaCl “ karya Angelia Septaningrum telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

Anggota I,

Dr.A.A. Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si.
NIP.197012251997022001

Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc.
NIP.198010012003122001

Anggota II,

Anggota III,

drh.Wuryanti Handayani, M.Si.
NIP.19600822198502002

Novita Andarini, S.Si., M.Si.
NIP.197211122000032001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam,

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D.
NIP. 195910091986021001

RINGKASAN

Pengaruh Cekaman Garam Terhadap Aktivitas Enzim Antioksidan Pada Tanaman Padi IR64 Melalui Variasi Waktu Pemberian dan Konsentrasi NaCl; Angelia Septaningrum, 131810301025; 2020: 23 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tanaman padi merupakan tanaman yang sangat sensitif oleh cekaman garam. Cekaman garam merupakan salah satu contoh dari cekaman abiotik yang disebabkan oleh tinggi rendahnya suhu, faktor lingkungan, dan salinitas. Cekaman garam tersebut bisa menyebabkan produksi ROS (*Reactivity Oxygen Species*) meningkat dan bisa menghasilkan radikal bebas di dalam tanaman tersebut. Mekanisme pertahanan yang diperlukan pada tanaman yang terkena cekaman garam tersebut adalah dengan adanya enzim antioksidan yang terdapat di dalam tanaman tersebut untuk meredam produksi ROS tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh cekaman garam terhadap aktivitas enzim CAT dan APX pada tanaman padi.

Tanaman padi dalam penelitian ini ditanam dalam media MS (*Murashige and Skoog*) yang kemudian diberi variasi waktu pemberian yaitu hari kesatu, ketiga, kelima, dan ketujuh. Variasi konsentrasi NaCl yang diberikan pada tanaman tersebut adalah sebesar 0; 100; dan 200 mM. Aktivitas enzim antioksidan diukur secara spektrofotometri dengan menggunakan kurva standar H₂O₂. Hasil penelitian ini terdapat pengaruh pemberian variasi waktu dan konsentrasi NaCl terhadap aktivitas enzim CAT dan APX. Nilai aktivitas enzim CAT dengan konsentrasi NaCl 100 mM pada hari kesatu, ketiga, kelima, dan ketujuh yaitu 41.85; 31.09; 29.54; 43.27 $\mu\text{mol}/\text{menit mL}$. Aktivitas enzim CAT tersebut terjadi kenaikan yang sangat signifikan dibandingkan pada tanaman padi dengan konsentrasi NaCl 0 mM. Kenaikan tersebut juga terjadi pada tanaman padi yang diberi konsentrasi NaCl 200 mM. Aktivitas enzim APX pada penelitian ini juga

terjadi kenaikan yang sangat signifikan pada konsentrasi 0; 100; dan 200 mM dengan variasi waktu pemberian yang sama yaitu hari kesatu, ketiga, kelima, dan ketujuh. Nilai aktivitas enzim APX dengan konsentrasi 100 mM pada hari kesatu, ketiga, kelima, dan ketujuh yaitu 242.2; 256.7; 309.6; 340.5 $\mu\text{mol}/\text{menitmL}$.



PRAKATA

Puji syukur atas segala rahmat dan hidayah yang dilimpahkan Allah SWT, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Cekaman Garam Terhadap Aktivitas Enzim Antioksidan Pada Daun Tanaman Padi IR64 Melalui Variasi Waktu Pemberian dan Konsentrasi NaCl” . Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan pengarahan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D. selaku Dekan fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah membimbing, meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam penulisan skripsi ini;
4. Drh. Wuryanti Handayani, M.Si selaku Dosen Penguji I dan Novita Andarini, S.Si., M.Si selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Tri Mulyono S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing Akademik
6. Segenap dosen pengajar Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.

Penulis berharap semoga setiap kalimat yang telah tertulis dalam skripsi ini dapat bermanfaat sebagai ilmu pengetahuan bagi pembaca.

Jember, Agustus 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
MOTTO.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tanaman Padi (Oryza Sativa L.)	4
2.2 Respon Padi Terhadap Cekaman Garam.....	5
2.3 Reactive Oxygen Species (ROS).....	6
2.4 ROS Secara Kimiawi.....	7
2.5 Pembentukan ROS Pada Tanaman di bawah Kondisi Stress Salinitas	8
2.6 Detoksifikasi ROS dengan Antioksidan.....	9
2.6.1 Hidrogen Peroksida (H₂O₂)	10
2.6.2 Katalase (CAT)	11
2.6.3 Askorbat Peroksidase (APX).....	12
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14
3.2 Alat dan Bahan	14

3.2.1 Alat	14
3.2.2 Bahan	14
3.3 Rancangan Penelitian	15
3.3.1 Diagram Alir Penelitian	15
3.3.2 Prosedur Penelitian	16
3.3.2.1 Penanaman Tanaman Padi	16
3.3.2.2 Pemberian NaCl pada Tanaman Padi	16
3.3.2.3 Ekstraksi Enzim Daun Tanaman Padi	16
3.3.2.4 Pembuatan Kurva Standar H ₂ O ₂	16
3.3.2.5 Aktivitas Enzim CAT	17
3.3.2.6 Aktivitas Enzim APX	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1 Pengaruh Waktu Pemberian dan Konsentrasi NaCl Terhadap Bentuk dan Warna Daun Tanaman Padi IR 64	18
4.2 Pengaruh Perlakuan NaCl Terhadap Aktivitas Enzim Katalase (CAT)	20
4.3 Pengaruh Waktu Pemberian dan Konsentrasi NaCl Terhadap Aktivitas Enzim Askorbat Peroksidase (APX)	21
BAB 5. Penutup	24
5.1 Kesimpulan	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Tanaman padi (Sumber: Mubarog, 2013)	4
Gambar 2. 2 Pembentukan ROS dengan transfer energi (Gill dan Tuteja, 2010) ..	7
Gambar 2. 3 Reaksi Haber-Weiss (Puntarulo et al., 1988).	8
Gambar 2. 4 Tranport elektron pada mitokondria (Dat. J et al., 2000).....	8
Gambar 2. 5 Reaksi enzim antioksidan (Gill dan Tuteja, 2010)	11
Gambar 2. 6 Reaksi enzim antioksidan (Gill dan Tuteja, 2010)	12
Gambar 4. 1 Tanaman padi terkena cekaman garam.....	18
Gambar 4. 2 Aktivitas Enzim Katalase	20
Gambar 4. 3 Aktivitas Enzim Askorbat Peroksidase.....	22

DAFTAR LAMPIRAN

3.1 Pembuatan Media Tanam MS	29
3.2 Pembuatan Stok Bufer Sodium fosfat	29
3.3 Pembuatan Bahan.....	29
3.4 Tabulasi Rancangan Penelitian.....	30
3.5 Pembuatan Kurva Standar H ₂ O ₂	30
3.6 Kurva Standar H ₂ O ₂ ($\lambda = 570$ nm)	32
3.7 Kurva Standar H ₂ O ₂ ($\lambda = 270$ nm)	32
3.5 Grafik dan Tabel Aktivitas Enzim CAT	33
3.6 Grafik dan Tabel Aktivitas Enzim APX	36

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman yang tumbuh di daerah terbuka sering terkena cekaman abiotik. Berbagai macam cekaman abiotik ini meliputi tinggi atau rendahnya suhu, kekeringan dan salinitas. Cekaman abiotik dapat mempengaruhi metabolisme tanaman secara langsung atau tidak langsung dan berakibat pada pertumbuhan, perkembangan, serta produktivitas tanaman. Salah satu cekaman abiotik yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah salinitas atau cekaman garam.

Cekaman garam terjadi karena adanya salinitas atau berlebihnya konsentrasi garam-garam terlarut dalam tanaman. Kelangsungan hidup pada kondisi cekaman bergantung pada kemampuan tanaman untuk memahami stimulus, dan memicu perubahan biokimia yang mengatur metabolisme yang sesuai (Hasegawa *et al.*, 2000). Menurut Ashraf dan Foolad (2007), cekaman garam pada tanaman berpengaruh pada efek ionik, osmotik, ketidakseimbangan nutrisi, dan produksi *Reactivity Oxygen Species* (ROS).

ROS merupakan radikal bebas yang berbahaya bagi makhluk hidup. Meskipun ROS diproduksi juga dalam kondisi normal pada konsentrasi rendah, namun ROS paling banyak diproduksi pada saat terdapat cekaman di lingkungannya. Oksigen penting bagi kehidupan, tetapi ketika tereduksi akan menghasilkan produksi ROS yang dengan mudah dapat mengganggu proses metabolisme pada tanaman. ROS dapat berada dalam bentuk seperti superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH^{\cdot}) (Foyer *et al.*, 1994).

ROS sangat reaktif karena dapat bereaksi dengan sejumlah molekul dan metabolit lainnya seperti DNA, pigmen, protein, lipid, dan molekul seluler penting lainnya. ROS di dalam tanaman dihasilkan dari jalur fotorespirasi, respirasi mitokondria, dan fotosintesis. Dalam mitokondria, kompleks I, ubiquinone dan kompleks III dari rantai transport elektron sebagai hasil utama $O_2^{\cdot-}$. Namun tanaman memiliki kemampuan untuk mencegah ROS dengan memproduksi antioksidan.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menangkal atau meredam efek negatif oksidan dalam tubuh. Cara kerja antioksidan adalah dengan mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktifitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat. Klasifikasi berdasarkan jenis utamanya yaitu, antioksidan enzimatis dan non enzimatis. Antioksidan enzimatis merupakan antioksidan yang terdapat dalam sel tanaman tersebut yaitu enzim superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), askorbat peroksidase (APX), serta glutathion reduktase (GR). Aktifitas enzim-enzim diatas untuk mengatasi terjadinya cekaman oksidatif dengan meningkatkan ketahanannya. Enzim-enzim tersebut bekerja menghambat pembentukan radikal bebas, dengan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil (Winarsih, 2007). Menurut Bosch dan Alegre, 2002 menyatakan bahwa sistem antioksidan di dalam sel tumbuhan menyediakan perlindungan melawan pengaruh racun dari ROS. Komponen penting dari system perlindungan itu adalah pertahanan secara enzimatis, seperti SOD dan katalase yang dapat menghindari O_2^- dan H_2O_2 untuk mengatur tingkat keaktifan oksigen pada jaringan tanaman.

Beberapa peneliti telah meneliti produksi enzim antioksidan dalam tanaman pada kondisi cekaman garam. Lee *et al.*, 2012 meneliti pengaruh cekaman garam terhadap aktivitas enzim antioksidan pada daun dan akar tanaman padi jenis *Pokkali* dan IR 29. Aktivitas SOD meningkat secara signifikan pada tanaman padi jenis *Pokkali* dan IR 29 pada hari ke 7 setelah pemberian NaCl 100 mM. Namun, aktivitas enzim antioksidan pada jenis padi *Pokkali* lebih tinggi daripada jenis IR 29. Dionisiosese dan Tobita (1998) juga menemukan penurunan yang signifikan pada aktivitas enzim SOD dan peningkatan aktivitas APX pada tanaman padi varietas Hitomebore dan IR28 karena cekaman garam.

Secara umum, padi menunjukkan sensitivitasnya terhadap cekaman garam pada berbagai tahap perkembangan selama siklus hidupnya (Zeng *et al.*, 2001). Pada tanaman padi sendiri yang dapat diamati tidak hanya antioksidan, tetapi pada sinyal transduksi, transkripsi, dan lain-lain (Singh *et al.*, 2008). Mengacu pada pernyataan di atas, maka dalam penelitian ini akan dikaji pengaruh adanya cekaman garam terhadap aktivitas enzim antioksidan dalam tanaman padi jenis IR

64 dengan mengambil sampel daunnya. Studi literatur yang telah dilakukan, belum didapatkan informasi adanya pengujian aktivitas antioksidan enzimatis tanaman padi IR 64 dalam keadaan cekaman garam.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang dapat diambil dalam penelitian ini adalah, bagaimana pengaruh variasi konsentrasi & lama waktu pemberian NaCl terhadap aktivitas enzim antioksidan jenis CAT dan APX pada tanaman padi IR 64.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variasi konsentrasi NaCl 0; 100, dan 200mM
2. Jenis padi IR 64 diperoleh dari toko pertanian “Santoso”
3. Variasi lama waktu pemberian NaCl 1; 3; 5; 7 hari

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh cekaman garam terhadap aktivitas enzim CAT, dan APX pada tanaman padi.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat dan peneliti terhadap respon tanaman padi yang tercekam oleh garam.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Padi (*Oryza Sativa L.*)

Padi merupakan komoditas tanaman yang terpenting di Indonesia. Data Badan Pusat Statistik menunjukkan bahwa produksi padi tahu 2012 sebesar 69,05 juta ton Gabah Kering Giling (GKG) atau mengalami kenaikan sebesar 3,29 juta ton (5,00 persen) disbanding tahun 2011. Kenaikan produksi terjadi karena peningkatan luas panen seluas 239,80 ribu hektar (1,82 persen) dan kenaikan produktivitas sebesar 1,56 kuintal/hektar (3,13 persen) (BPS, 2013). Tanaman padi (*Oryza Sativa L*) diduga berasal dari asia. Varietas padi di dunia ini terdapat 20.000. Tanaman padi tradisional di Asia yang beriklim tropis bersifat tinggi dan lemah, dengan daun-daun yang melengkung ke bawah dan massa dormansinya lama (Haryadi, 2006).

Tanaman padi merupakan tanaman pangan berupa rumput berumpun yang sangat mudah ditemukan, apalagi kita yang tinggal di daerah pedesaan dengan hamparan lahan persawahan yang dipenuhi dengan tanaman padi. Tanaman padi termasuk genus *Oryza L*, yang meliputi kurang lebih 25 spesies yang tersebar di daerah tropis dan daerah subtropis seperti Asia, Afrika, Amerika dan Australia. Padi juga merupakan bahan makanan menghasilkan beras yang banyak mengandung gizi dan penguat yang cukup bagi tubuh manusia, dikarenakan dalam beras tersebut terkandung bahan-bahan yang mudah diubah menjadi energi (AAK,1990).



Gambar 2. 1 Tanaman padi (Sumber: Mubaroq, 2013)

2.2 Respon Padi Terhadap Cekaman Garam

Cekaman garam merupakan salah satu dari bentuk cekaman tanaman yaitu cekaman suhu, air, radiasi, bahan kimia, dan angin, bunyi, tekanan, dan lainnya. Cekaman garam termasuk cekaman bahan kimia yang meliputi ion-ion, garam, herbisida, insektisida, dan lain sebagainya (Harjadi dan Yahya, 1988). Cekaman garam terjadi dengan adanya salinitas atau konsentrasi garam terlarut yang berlebihan pada tanaman. Cekaman garam meningkat dengan meningkatnya konsentrasi garam hingga tingkat konsentrasi tertentu yang dapat mengakibatkan kematian tanaman.

Peningkatan konsentrasi garam terlarut di dalam tanah akan meningkatkan tekanan osmotik sehingga menghambat penyerapan air dan unsur-unsur hara yang berlangsung melalui proses osmosis. Jumlah air yang masuk kedalam akar akan berkurang sehingga dapat menyebabkan menipisnya jumlah persediaan air di dalam tanaman. Salinitas akan mempengaruhi sifat fisik dan kimia tanah, yaitu (1) tekanan osmotik meningkat, (2) peningkatan potensi ionisasi, (3) infiltrasi tanah yang menjadi buruk, (4) kerusakan dan terganggunya struktur tanah, (5) permeabilitas tanah yang buruk, dan (6) penurunan konduktivitasn (Follet *et al.*, 1981)

Gejala pertumbuhan tanaman pada tanah dengan tingkat salinitas yang cukup tinggi adalah pertumbuhan yang tidak normal seperti daun mengering di bagian ujung dan gejala khlorosis. Gejala ini timbul karena konsentrasi garam terlarut yang tinggi menyebabkan menurunnya potensial larutan tanah sehingga tanaman kekurangan air. Semakin tinggi konsentrasi NaCl pada tanah, semakin tinggi tekanan osmotik dan daya hantar listrik tanah.

Kandungan Na^+ yang tinggi pada tanah juga menyebabkan kerusakan struktur tanah. pH tanah menjadi lebih tinggi karena kompleks serapan dipenuhi oleh ion Na^+ . Hal ini akan meningkatkan presentase pertukaran Natrium (*Exchangable Sodium Percentage*, ESP). Pertumbuhan tanaman akan menurun bila ESP mencapai 10% (Basri, 1991).

Beberapa peneliti sedang mengembangkan penelitian mengenai cekaman garam pada tanaman padi dan target nya adalah genetika. Peningkatan ROS dibawah kondisi cekaman abiotik ini dapat merusak sel pada tanaman ini. Matsumura *et al.*, (2002) meneliti tentang peningkatan enzim katalase pada tanaman padi dibawah cekaman abiotik. Peningkatan askorbat peroksidase pada tanaman padi juga diteliti oleh Lee *et al.*, (2013).

2.3 Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan kelompok radikal bebas, molekul reaktif dan ion yang berasal dari oksigen (O_2). Kandungan ROS dalam jumlah berlebihan dapat mengakibatkan kerusakan, namun dalam jumlah yang tidak berlebihan dapat berperan penting dalam metabolisme tanaman. Pada konsentrasi tinggi dapat mengakibatkan kerusakan biomolekul, sedangkan pada konsentrasi rendah atau sedang, berperan sebagai sinyal intraseluler yang memediasi beberapa respon di dalam sel tanaman (Sharma *et al.*, 2012). ROS diproduksi secara berkelanjutan sebagai produk samping dari berbagai mekanisme metabolisme, misalnya saja fotosintesis, yang terlokalisasi di berbagai bagian sel seperti di mitokondria, kloroplas, dan peroksisom (Navrot *et al.*, 2007).

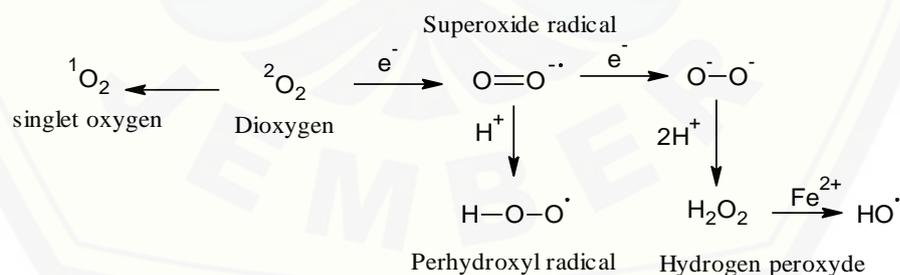
Akumulasi senyawa ROS dapat digunakan sebagai salah satu respon beragam cekaman lingkungan, yang menjadikannya sebagai faktor utama penyebab berkurangnya produktivitas tanaman. Senyawa tersebut mempengaruhi berbagai fungsi seluler dengan merusak asam nukleat, mengoksidasi protein, dan mengakibatkan peroksidasi lipid (Mittler *et al.*, 2002). Menurut Yordanov *et al.*, (2000), produksi ROS yang berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif yang berpengaruh terhadap kerusakan tanaman dengan mengoksidasi pigmen fotosintesis, membrane lipid, protein, dan asam nukleat.

Cekaman garam dapat mengakibatkan terbatasnya proses fotosintesis, diikuti dengan pembentukan senyawa-senyawa ROS berupa radikal superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (Foyer *et al.*, 1994). Molekul $O_2^{\cdot-}$ diproduksi melalui reduksi O_2 selama proses transport elektron di dalam kloroplas, pada fotosistem 1. Pembentukan molekul tersebut memicu

terbentuknya senyawa ROS yang lebih reaktif, terutama berupa radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) dan singlet oksigen, yang dapat mengakibatkan peroksidasi pada membran lipid (Halliwell, 2006). Hidrogen peroksida pada konsentrasi rendah berperan sebagai sinyal molekuler yang memicu berbagai mekanisme toleran terhadap cekaman abiotik maupun biotik, sedangkan pada konsentrasi tinggi dapat memicu terjadinya kematian sel, bersifat stabil sehingga dapat bertahan dalam waktu yang lama dan memiliki permeabilitas terhadap membran yang tinggi (Quan *et al.*, 2008). Hidrogen peroksida (H_2O_2) dapat mempengaruhi peningkatan aktivitas antioksidan enzimatik berkaitan dengan perannya sebagai prekursor dan bagian dari ROS (Mittler, 2002).

2.4 ROS Secara Kimiawi

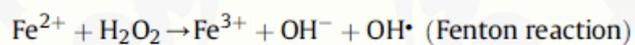
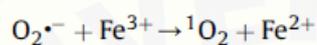
ROS berada di kloroplas, mitokondria atau peroksisom dengan aktivitas metabolisme sebagai sumber utama ROS didalam sel tanaman. Munculnya O_2 dalam proses metabolisme dan menggunakan O_2 sebagai akseptor elektron terakhir memicu adanya ROS didalam sel. Reduksi satu elektron dari O_2 dapat menghasilkan $\text{O}_2\cdot^-$. Pada pH yang rendah, dismutase $\text{O}_2\cdot^-$ tidak dapat dihindari, dengan satu $\text{O}_2\cdot^-$ dapat memberikan elektronnya untuk membentuk radikal yang lain. Selanjutnya dengan adanya protonasi dapat membentuk H_2O_2 . Selanjutnya $\text{O}_2\cdot^-$ bisa diprotonasi untuk membentuk $\text{HO}_2\cdot$.



Gambar 2. 2 Pembentukan ROS dengan transfer energi (Gill dan Tuteja, 2010)

Radikal bebas mampu bereaksi tanpa pandang bulu dengan setiap molekul yang berkontak dengannya, menarik elektron, dan membentuk radikal bebas yang baru dalam reaksi berantai oksidatif sitotoksik. Hidrogen peroksida, walaupun sebenarnya bukan suatu radikal, adalah zat pengoksidasi dan dengan adanya Fe^{2+} atau logam transisi lainnya, menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi Fenton.

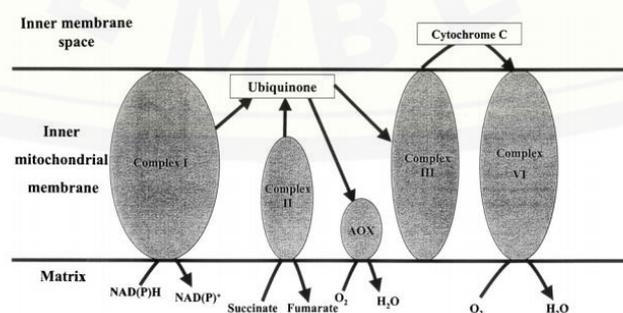
Hidrogen peroksida larut dalam lemak sehingga dapat menimbulkan kerusakan di membrane local yang mengandung Fe^{2+} yang terletak jauh dari tempat pembentukannya. Radikal superoksida, yang dapat terbentuk dari O_2 bebas dengan pemberian satu electron ke radikal bebas yang lain, sangat reaktif tetapi memiliki kelarutan lemak yang terbatas dan tidak dapat berdifusi jauh. Namun radikal $\text{O}_2\cdot^-$ juga dapat menghasilkan radikal hidroksil dan hidroperoksi yang lebih reaktif melalui reaksi dengan hydrogen peroksida dalam reaksi Haber-Weiss (Puntarulo *et al.*, 1988).



Gambar 2. 3 Reaksi Haber-Weiss (Puntarulo *et al.*, 1988).

2.5 Pembentukan ROS Pada Tanaman di bawah Kondisi Stress Salinitas

ROS merupakan radikal bebas yang memiliki satu elektron tidak berpasangan. Ini adalah konfigurasi yang sangat tidak stabil, jadi radikal tersebut bereaksi dengan molekul lain untuk menghasilkan lebih banyak radikal, karena elektron cenderung berpasangan untuk menghasilkan dua elektron stabil (Foyer and Halliwell, 1976). Produksi ROS terbentuk di beberapa sel antara lain kloroplas, mitokondria, dan peroksisom. Produksi ROS terjadi selama proses metabolismenya.



Gambar 2. 4 Tranport elektron pada mitokondria (Dat. J *et al.*, 2000)

Fungsi utama mitokondria adalah sintesis ATP. Elektron yang tereduksi dilewatkan dari kompleks I dan II dari rantai transpor electron kompleks III dan IV sampai oksigen, membentuk air dan menyebabkan proton dipompa melewati mitokondria membran dalam. Proton dipompa kembali melalui sintesis ATP di membran dalam, membentuk ATP dari ADP dan fosfat. Ada dua reaksi samping utama yang relevan. Elektron bisa lepas dari rantai pernapasan dan bereaksi secara tidak tepat dengan oksigen untuk membentuk radikal superoksida, dan proton yang dipompa dapat lepas kembali melewati membran dalam, dan berpindah energi dari ATP sintesis.

2.6 Detoksifikasi ROS dengan Antioksidan

Mekanisme pertahanan oleh antioksidan merupakan bentuk perlindungan yang penting terhadap kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh akumulasi ROS di membran sel dan organel tanaman, yang tumbuh di lingkungan yang tidak menguntungkan (Kocsy *et al.*, 1996). Antioksidan yang berperan dalam sistem detoksifikasi terhadap ROS terbagi menjadi dua komponen, yaitu berupa enzim (enzimatik) dan non-enzim (non-enzimatik) (Scandalios, 2005). Antioksidan non-enzimatik antara lain ascorbate, glutathione, flavonoids, fenolik, alkaloid, tocopherol, dan karotenois (Gratao *et al.*, 2005). Sedangkan antioksidan enzimatik berupa SOD, APX, CAT, glutathione peroksidase, dan peroksidredoksin. Biasanya dalam suatu organel, bisa terdapat lebih dari satu enzim untuk menangkal satu senyawa ROS (Mittler, 2002).

Shikanai *et al.* (1998) menyatakan bahwa di dalam kloroplas, superoxide yang terbentuk pada photosistem 1 akibat rendahnya karbondioksida yang diserap, akan dikonversi menjadi hydrogen peroxide (H_2O_2) dan O_2 oleh enzim superoxide dismutase (SOD), kemudian dikonversi kembali menjadi air (H_2O) oleh enzim APX. Enzim APX merupakan antioksidan yang memiliki peran utama dalam mengkatalis proses reduksi H_2O_2 menjadi H_2O dengan menggunakan ascorbate sebagai substrat yang akan berperan sebagai donor elektron (Nakano dan Asada, 1999).

2.6.1 Hidrogen Peroksida (H_2O_2)

Hidrogen peroksida (H_2O_2) adalah cairan bening, agak lebih kental daripada air, yang merupakan oksidator kuat. H_2O_2 pertama kali diisolasi melalui reaksi barium peroksida dan asam nitrat oleh Louis Jacques Thenard pada tahun 1818. Proses ini digunakan untuk menghasilkan H_2O_2 sejak akhir abad ke-19 sampai pertengahan abad ke-20. H_2O_2 murni ditemukan pertama kali oleh Richard Wolffenstein pada tahun 1894 melalui destilasi vakum. Nama lainnya adalah dioksida dihidrogen, dihidrogen dioksida, hidrogen dioksida atau dioksidan. H_2O_2 sangat melimpah di alam, terutama terbentuk oleh rangsangan cahaya matahari pada air dan ditemukan pada air hujan dan salju (Handoko dan Sumilat, 2011).

Hidrogen peroksida mempunyai sifat fisik: berat molar 34,0147 g/mol, densitas 4 g/cm³ (cair), titik cair -11 °C (262,15K), titik didih 150,2 °C (423,35K), keasaman (pKa) 11,65, viskositas 1,245 P pada suhu 20 °C, dengan penampakan tidak berwarna dan tidak berbau (Williams, 2003) . H_2O_2 adalah oksidan yang lebih kuat dari klorin, klorin dioksida dan kalium permanganat (US peroxide, 2008)

H_2O_2 dengan ion oksigen dan radikal bebas termasuk dalam reactive oxygen species (ROS). ROS adalah produk metabolisme oksigen dalam tubuh normal yang bersifat sangat reaktif, yang disebut radikal bebas adalah radikal superoksida (O_2^-), radikal hidroksil, (OH^-) dan radikal hidroperoksil (HO_2^-) (Nindi, 2004). Radikal bebas yang terbentuk akan bereaksi dengan SOD dan ion Cu^{2+} menjadi H_2O_2 . Hidrogen peroksida (H_2O_2) ini banyak diproduksi di mitokondria dan dapat menembus membran sel. Sebagai sistem pertahanan tubuh, H_2O_2 oleh enzim CAT dapat diubah menjadi H_2O dan O_2 . Hidrogen peroksida ini merupakan oksidan yang kuat karena dapat bereaksi dengan berbagai senyawa. Hidrogen peroksida juga dapat bereaksi dengan Fe^{2+} dan Cu^{2+} sehingga terbentuk radikal hidroksil melalui reaksi Fenton.

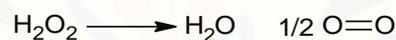
Nilai produksi dan pembersihan ROS berada dalam keadaan seimbang pada tubuh yang sehat. Bila ada penambahan oksidan eksogen seperti asap rokok, polusi udara, sinar ultraviolet, radiasi, obat seperti cisplatin dan aminoglikosida,

atau asupan kalori yang berlebihan, maka keseimbangan ini akan bergeser ke arah pembentukan ROS yang lebih banyak (Nindi, 2004).

2.6.2 Katalase (CAT)

Katalase sebagai antioksidan endogen mempunyai peran yang sangat penting dalam mengontrol radikal bebas berupa konsentrasi H_2O_2 . Katalase (CAT) mengkatalisis H_2O_2 menjadi oksigen (O_2) dan air (H_2O) sehingga bersifat non toksik. Katalase merupakan perombak H_2O_2 menjadi air dan oksigen sehingga enzim ini merupakan enzim yang sangat penting dalam mekanisme pertahanan sel terhadap cekaman oksidatif pada tanaman (Dat. J *et al.* 2003).

CAT merupakan antioksidan enzimatik yang berpotensi secara langsung mendismutasi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 dan sangat diperlukan untuk mendetoksifikasi ROS selama kondisi tercekam (Garg and Manchanda, 2009). Enzim tersebut tidak memerlukan agen pereduksi untuk mendismutasi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Mallick and Mohn, 2000).



Gambar 2. 5 Reaksi enzim antioksidan (Gill dan Tuteja, 2010)

Dua molekul H_2O_2 pada katalase berfungsi sebagai akseptor elektron dan donor elektron (aktivitas katalitik) menghasilkan molekul oksigen (O_2) dan air (H_2O). dalam dekomposisi hydrogen peroksida bertindak sebagai donor atom hidrogen (akseptor elektron dan oksidator) dan molekul hidrogen peroksida yang kedua bertindak sebagai substrat dan akseptor atom-atom hidrogen (donor elektron, reduktor). Satu molekul hidrogen peroksida direduksi menjadi $2OH^-$ dan yang lain dioksidasi menjadi O_2 dan $2H^+$, menghasilkan produk $2H_2O$ dan O_2 (West and Tood, 1961).

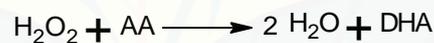
Katalase berfungsi sebagai pelindung sel dari pengaruh racun hidrogen peroksida dan mengkatalisa dekomposisinya menjadi oksigen dan air tanpa menghasilkan radikal bebas. Katalase mempunyai dua fungsi. Pertama kemampuan untuk menghilangkan H_2O_2 (hidrogen peroksida) berlebih yang

dihasilkan pada metabolisme oksidatif, dan kedua kemampuan untuk menggunakan H₂O₂ dalam oksidasi fenol, alkohol dan donor hidrogen lain.

2.6.3 Askorbat Peroksidase (APX)

Askorbat peroksidase (APX) merupakan salah satu produk seluler dalam tubuh tanaman yang berperan penting dalam sistem antioksidan. Apx menggunakan dua molekul dari askorbat sebagai reduktan untuk mereduksi H₂O₂ menjadi air di berbagai bagian sel yang berbeda (Tarchoune *et al.*, 2010). Setidaknya, terdapa lima isoform APX yang telah teridentifikasi terdapat di tanaman, antara lain isoform sitosolik, mitokondria, peroksisomal, dan kloropastik (Miyake and Asada, 1996).

Respon APX akan secara langsung terjadi sebagai perlindungan sel tanaman terhadap kondisi lingkungan yang bersifat merugikan. Tanaman rekayasa yang mengandung gen APX menunjukkan perubahan pada pertumbuhan tanaman, fisiologi, dan produksi antioksidan yang berperan sebagai enzim sebagaimana dalam perkembangan tanaman normal (Caverzan *et l.*, 2012)



Gambar 2. 6 Reaksi enzim antioksidan (Gill dan Tuteja, 2010)

Askorbat peroksidase merupakan salah satu kelompok yang paling penting dari enzim antioksidan tanaman. Lima isoform APX telah diidentifikasi pada tanaman: isoform sitosol, isoform mitokondria, isoform peroxisomal/glyoxysomal dan isoform chloroplastic. Semua bentuk APX diperkirakan berfungsi sebagai pengikat H₂O₂ yang dihasilkan terus menerus disel APX isoform memainkan peran protektif terhadap ROS yang dihasilkan lebih ketika adanya tekanan lingkungan. Oleh karena itu tingkat ekspresi mereka sering mencerminkan terjadinya kondisi stres (Dabrowska, 2007)

Sampai saat ini banyak penelitian tentang pemurnian, kloning molekuler dari askorbat peroksidase isoenzim berdasarkan *enzymological* dan pendekatan molekuler telah diterbitkan. Studi ini menunjukkan bahwa APX isoenzim adalah

komponen penting, yang mencegah cekaman oksidatif dalam organisme fotosintetik (Yan-Xia et al., 2009).



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2018 sampai Desember 2019 di CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

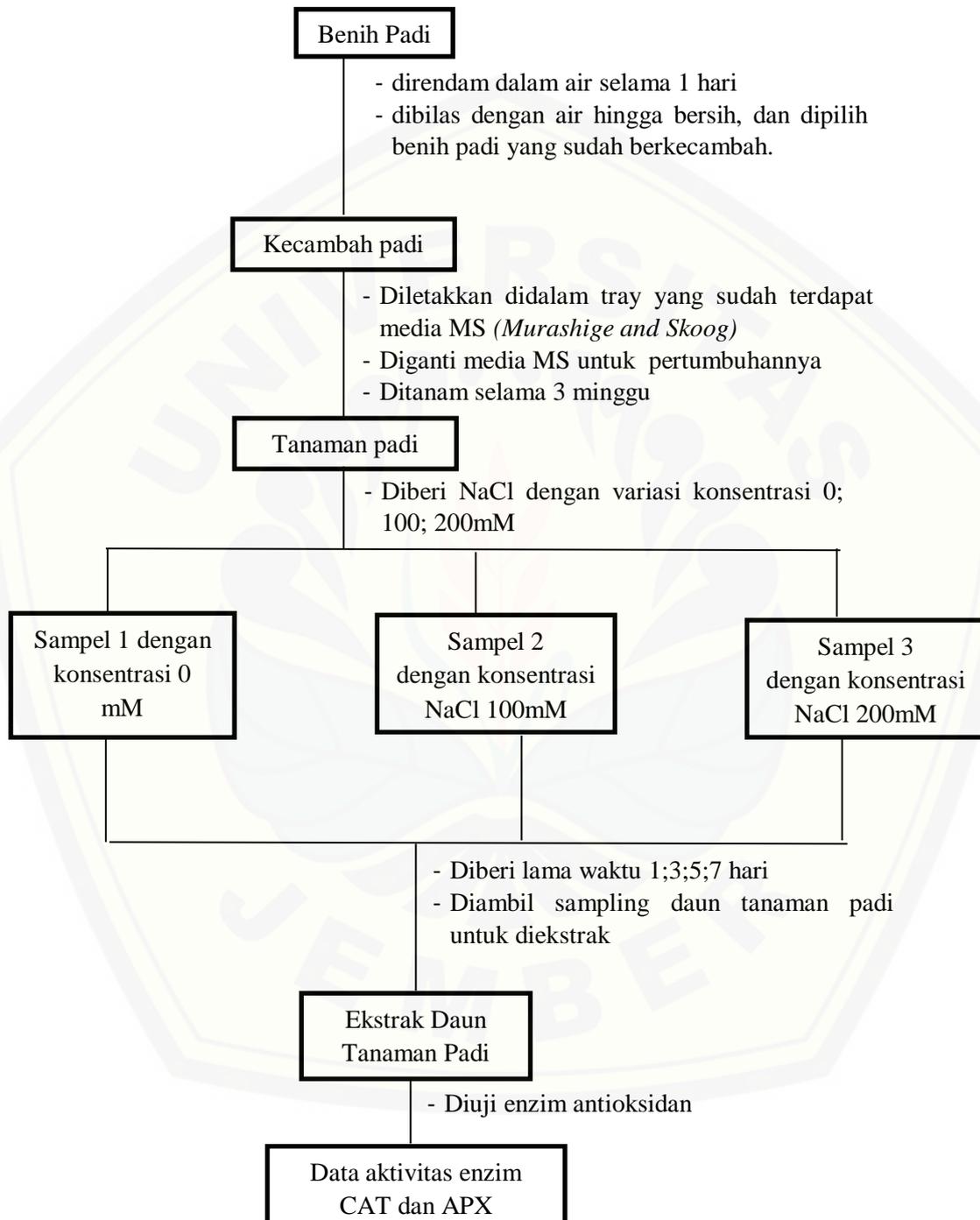
Peralatan yang digunakan dalam penelitian digolongkan menjadi peralatan gelas, instrument, dan peralatan bukan gelas. Peralatan gelas meliputi gelas ukur 250 ml, tabung reaksi, labu ukur 5, 10, 100 ml. Peralatan instrument meliputi neraca analitik, sentrifuge Hitachi CF15RXII, satu set alat spektrofotometer Hitachi U-2900, pipet mikro. Peralatan bukan gelas antara lain gunting, kertas label, *ependorf*, aluminium foil, *tray* semai, baskom.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun tanaman padi (*Oryza sativa L.*), NaCl, NaH₂PO₄, EDTA, (NH₄)₂SO₄, buffer sitrat fosfat, asam askorbat, Triton-X, PVP, Hidrogen Peroksida (H₂O₂) serta bahan pendukung lainnya.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Diagram Alir Penelitian



3.3.2 Prosedur Penelitian

3.3.2.1 Penanaman Tanaman Padi

Benih padi varietas IR 64 direndam dalam air dan dibiarkan selama 1 hari, lalu dibilas dengan air hingga bersih dan dipilih benih padi yang berkecambah. Benih padi yang tidak berkecambah dibuang karena tidak bisa digunakan. Kemudian benih yang sudah berkecambah ditanam dalam *tray* semai berisi tanah yang diletakkan didalam baskom berisi media MS (*Murashige and Skoog*) sebagai nutrisi.

3.3.2.2 Pemberian NaCl pada Tanaman Padi

Tanaman padi yang sudah berumur 3 minggu diberi perlakuan dengan memberi NaCl pada tiap baskom berisi MS dengan variasi konsentrasi 0; 100; 200mM. Sehingga terdapat sampel 1, 2, dan 3, lalu masing-masing sampel direndam dengan NaCl dengan lama waktu 1; 3; 5; 7 hari. Tanaman padi diambil sampling untuk diekstrak (Rancangan penelitian terdapat pada lampiran 3.4).

3.3.2.3 Ekstraksi Enzim Daun Tanaman Padi

Daun tanaman padi ditimbang sebanyak 0,1 g, dan digerus dengan 1,5 ml buffer sodium fosfat 50 mM, yang terdiri dari 1 mM EDTA, 0,05% Triton X, dan 2% PVP, pH buffer 7. Setelah itu disentrifugasi 18.000rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan diambil dan dipindah ke *tube* yang baru untuk diuji aktivitas CAT, dan APX (Soundararajan *et al.*, 2015)

3.3.2.4 Pembuatan Kurva Standar H₂O₂ ($\lambda = 570$ nm dan $\lambda = 270$ nm)

Larutan standar H₂O₂ 0,4 M dibuat dengan melarutkan H₂O₂ 30% sebanyak 4,1 mL diencerkan dalam labu ukur 100 mL yang disebut larutan induk. Selanjutnya dari larutan induk tersebut dibuat sederet larutan standar H₂O₂ dengan konsentrasi 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; dan 0,2 M. Masing-masing larutan standar dipipet sebanyak 1 ml, ditambahkan 1,5 mL larutan warna K₂Cr₂O₇.

Larutan tersebut dipanaskan dalam air selama 5 menit dan setelah dingin diukur absorbansinya pada panjang gelombang 570 nm.

Larutan standar H_2O_2 0.6 M dibuat dengan melarutkan H_2O_2 30% sebanyak 10.2 mL diencerkan dalam labu ukur 100 mL yang disebut larutan induk. Selanjutnya dari larutan induk tersebut dibuat sederet larutan standar H_2O_2 dengan konsentrasi 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 dan 0.6 M. Masing-masing larutan standar dipipet sebanyak 100 μl , ditambahkan 2500 μl buffer sodium fosfat dan 100 μl asam askorbat. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 270 nm.

3.3.2.5 Aktivitas Enzim CAT

Aktivitas enzim CAT dianalisa dengan metode Sinha 1978 yang dimodifikasi dengan menggunakan larutan pewarna $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Ion bikromat akan direduksi oleh H_2O_2 menjadi kromat yang memberikan warna pada panjang gelombang 570 nm. Sampel dari hasil ekstraksi diambil supernatan sebanyak 100 μL . Sebanyak 2800 μL buffer fosfat ditambahkan lalu divortex,. Selanjutnya ditambahkan 100 μL H_2O_2 dan ditambahkan 1000 μL larutan warna $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, divortex,. Larutan tersebut didiamkan selama 5 menit lalu diukur pada panjang gelombang 570 nm. Aktivitas enzim CAT diperoleh dari kurva standar H_2O_2 . Kontrol yang digunakan adalah tanaman padi dengan konsentrasi NaCl 0 mM. Perhitungan aktivitas enzim CAT terdapat pada lampiran 3.8

3.3.2.6 Aktivitas Enzim APX

Aktivitas APX dianalisis berdasarkan metode Kodkhodaie *et al.* (2013), supernatan yang diperoleh dari ekstraksi bufer, diambil sebanyak 100 μl , dengan penambahan 2500 μl buffer ekstraksi, 100 μl asam askorbat, dan 300 μl H_2O_2 30 %. Selanjutnya absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 290 nm. Aktivitas enzim APX diperoleh dari kurva standar H_2O_2 pada panjang gelombang 270 nm. Kontrol yang digunakan adalah tanaman padi dengan konsentrasi NaCl 0 mM. Aktivitas enzim APX terdapat pada lampiran 3.9.

BAB 5. Penutup

5.1 Kesimpulan

Terdapat pengaruh pemberian variasi konsentrasi NaCl terhadap aktivitas enzim CAT dan APX. Aktivitas enzim CAT dan APX terjadi peningkatan pada waktu pemberian konsentrasi NaCl (0; 100; dan 200 mM) dari hari kesatu, kelima, dan ketujuh.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan lebih meneliti kandungan klorofil, dan analisis aktivitas enzim SOD dan Gluthation Peroksidase (GPX)

DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1990. *Budidaya Tanaman Padi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Ashraf, M., dan M. R. Foolad. 2007. Improving plant abiotic-stress resistance by exogenous application of osmoprotectants glycinebetaine and proline. *Env Exp Bot.* 59: 206-216.
- Badan Pusat Statistika. 2013. *Laporan Tahunan Data Sosial Ekonomi*. Surabaya: BPS Jawa Timur.
- Basri, H. 1991. Pengaruh Stres Garam Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Empat Varietas Kedelai. Bogor: Program Pascasarjana IPB
- Cakmak, I., dan H. Marschner. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 98: 1222-1227
- Caverzan, A., G. Passaia, S. B. Rosa, C.W. Ribeiro, F. Lazzarotto, dan M. Margis-Pinheiro. 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol.* 35(4): 1011-1019
- Christou, A., G.A. Manganaris, dan V. Fotopoulos. 2014. Systemic mitigation of salt stress by hydrogen peroxide and sodium nitroprusside in strawberry plants via transcriptional regulation of enzymatic and non enzymatic antioxidants. *Environ. Exp. Bot.* 107:46-54
- Dat., J., S, Vandenabeele., E, Vranova., M, Van Montagu., D, Inze., dan F, Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences.* 57: 779-795
- Dat, J. F., R. Pellinen, T. Beeckman, B. Van De Cotte, C. Langerbartles, dan J. Kangasjarvi. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J.* 33: 621-632
- Dionisiosese, ML., dan S. Tobita. 1998. Antioxidant response of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135: 1-9
- Follet, RH., L. S. Murphy, R. L. Donahue. 1981. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. UI Press: Jakarta

- Foyer, CH., dan B. Halliwell. 1976. Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 133: 5-21
- Foyer, C.H., dan J. Harbison. 1994. *Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport*. Dalam Causes of photooxidative stresses and amelioration of defense systems in plants. Editor P. Mullineaux. Boca Raton, Florida, USA: CRC. Press
- Garg, N., dan G. Manchanda. 2009. ROS generation in plants: Boon or bane. *Plant Biosystems*. 143(1): 81-96
- Gill, S. S., dan, N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 909-930
- Gratao, PL., A. Polle, PJ. Lea, RA. Azevedo. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol*. 32: 481-494
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants, redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 141: 312-322
- Handoko E., Sumilat W. 2011. *Metabolisme Hidrogen Peroksida dan Peranannya Pada Infeksi Telinga*. Malang: Universitas Brawijaya
- Harjadi, S. S., dan S. Yahya. 1988. *Fisiologi Stress Tanaman*. : Bogor : PAU IPB
- Haryadi. 2006. *Teknologi Pengolahan Beras*. Yogyakarta: Gajahmada University Press
- Hasegawa, P.M., R. A. Bressan, dan J. M. Pardo. 2000. The dawn of plant salt tolerance genetics. *Trends Plant Sci*. 5: 317-319
- Kodkhodaie, A., R. Jamshid, dan Z. Morteza. 2013. Peroxidase, ascorbate peroxidase, and catalase activities in drought sensitive, intermediate, and resistance sesame (*Sesamum indicum L.*) Genotypes. *Agronomy and Plant Production*. 4(11): 3012-3021

- Lu, Z., D. Liu, dan S. Liu. 2007. Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic arabidopsis. *Plant Cell*. 26: 1909-1917
- Mallick, N., dan F. H. Mohn. 2000. Reactive oxygen species: responses of algal cells. *Plant Physiology*. 157: 183-193
- Marklund, S., dan G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Journal Biochem*. 47: 469-474
- Matsumura, t., N. Tabayashi, Y. Kamagata, C. Souma, H. Saruyama. 2002. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Plant Physiol*. 116: 317-327
- Min Hee Lee., Eun Ju Cho., seun Gon Wi., Hyoungwoo Bae., Ji Eun Kim., Jae-Young Cho., Sungbeom Lee., Jin Hong Kim., dan Byung Yeoup Chung. 2013. Divergences in morphological changes and antioxidant responses in salt-tolerant and salt-sensitive rice seedlings after salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 70: 325-335
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Sci*. 7: 405-410
- Mubarq, I. A. 2013. *Kajian Potensi Bionetrien Caf dengan Penambahan Ion Logam terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman Padi*. Bandung: UPI.
- Nakano, Y., dan K. Asada. 1991. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 22: 867-880
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., dan Jaquot, JP. 2007. Reactive oxygen specie generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant*. 128: 185-195
- Puntarulo. S., R.A. Sanchez., A, Boveris. 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset germination. *Plant Physiol*. 86: 626-630

- Quan, L. J., B. Zhang, W. W. Shi, dan H. Y. Li. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Plant Biol.* 50: 2-18
- Scandalios, JG. 2005. Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 38: 995-1014
- Sharma, P., B. A. Jha, R. S. Dubey, dan Pessarakli, 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany.* 1-26
- Singh, A.K., A. Pareek, M. W. Ansari, dan S. L. Singla. 2008. Raising salinity tolerant rice: recent progress and future perspectives. *Physiology and Molecular Biology of Plants.* 14(1&2): 137-154
- Soundararajan, P., A. Manivannan, Y. G. Park, S. Muneer, dan B. R. Jeong. 2015. Silicon Alleviates Salt stress by Modulating Antioxidant Enzyme Activities in *Dianthus caryophyllus* 'Tula'. *Biotechnol.* 56(2): 233-239
- Stepien, P., dan G. Klobus. 2005. Antioxidant defense in the leaves of C₃ and C₄ plants under salinity stress. *Physiol Plant.* 125: 31-40
- Tarchoune, I., C. Sgherri, R. Izzo, M. Lachaal, Z. Ouerghi, dan F. Nacaro-Izzo. 2010. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization. *Plant Physiology and Biochemistry.* 48: 772-777
- Widowati, W., R. Safitri, R. Rumumpuk, dan M. Siahaan. 2005. Penapisan aktivitas superoksida dismutase pada berbagai tanaman. *JKM.* 5(1): 33-48
- Winarsih, H. 2007. Antioksidan alami dan radikal bebas (5 ed). Yogyakarta: Kanisius
- Yordanov, I., V. Velikova, dan T. Tsonev. 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica.* 38: 171-186
- Zeng, L., M. C. Shannon, dan S. M. Lesch. 2001. Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. *Agric. Water Manag.* 48 : 191-206.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Pembuatan Media Tanam MS (*Murashige and Skoog*)

Media tanam dibuat dengan menimbang 4.43 g dilarutkan dalam 1 L aquades

Lampiran 3.2 Pembuatan Bufer Sodium Fosfat

Stok Bufer :

Bufer A : Na_2HPO_4 – BM (177.99 g/mol)

Untuk 0.2 M

$$M = \frac{n}{v}$$

$$0.2 \text{ M} = \frac{\frac{m}{177.99 \text{ g/mol}}}{0.1 \text{ L}}$$

$$m = 7.163 \text{ g dalam } 100 \text{ mL}$$

Bufer B : NaH_2PO_4 – BM (137.99 g/mol)

Untuk 0.2 M

$$M = \frac{n}{v}$$

$$0.2 \text{ M} = \frac{\frac{m}{137.99 \text{ g/mol}}}{0.1 \text{ L}}$$

$$m = 7.163 \text{ g dalam } 100 \text{ mL}$$

$$M = \frac{n}{v}$$

$$0.2 \text{ M} = \frac{\frac{m}{137.99 \text{ g/mol}}}{0.1 \text{ L}}$$

$$m = 2.760 \text{ g dalam } 100 \text{ mL}$$

Bufer kerja (untuk 50 mM)

A = 30.5 mL + B = 19.5 mL (ditambah akuades sampai 200 mL)

Lampiran 3.3 Pembuatan Bahan

- 1 mM EDTA (*Etilenadiaminatetraasetat*)

BM = 292.24 g/mol

$$M = \frac{n}{v}$$

$$0.001 \text{ M} = \frac{\frac{m}{292.24 \text{ g/mol}}}{0.1 \text{ L}}$$

$$m = 0.029 \text{ g}$$

- 0.05 % Triton X (v/v)

0.05 mL dalam 100 mL akuades

- 2 % PVP (b/v)

2.0 g dalam 100 mL akuades

Lampiran 3.4 Tabulasi Rancangan Penelitian

Hari \ Sampel	0 mM (K0)			100 mM (K1)			200 mM (K2)		
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3
1	H1K0	H1K0	H1K0	H1K1	H1K1	H1K1	H1K2	H1K2	H1K2
3	H3K0	H3K0	H3K0	H3K1	H3K1	H3K1	H3K2	H3K2	H3K2
5	H5K0	H5K0	H5K0	H5K1	H5K1	H5K1	H5K2	H5K2	H5K2
7	H7K0	H7K0	H7K0	H7K1	H7K1	H7K1	H7K2	H7K2	H7K2

Lampiran 3.5 Pembuatan Kurva Standar H₂O₂

Stok konsentrasi H₂O₂ 30 %

$$M = \frac{\text{mol}}{\text{volume (L)}}$$

$$M = \frac{\frac{\text{massa zat}}{Mr}}{\text{volume (L)}}$$

$$M = \frac{\frac{\% \times \rho \times 1000 \text{ mL}}{34}}{1 \text{ L}}$$

$$M = \frac{\frac{30}{100} \times 1.1 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 1000 \text{ mL}}{34 \text{ g/mol}}$$

$$M = \frac{30 \times 1.1 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 10 \text{ mL}}{34 \text{ g/mol}}$$

$$M = 9.8 \text{ M}$$

Pengenceran untuk larutan induk 0.4 M

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$9.8.V1 = 0.4.100$$

$$V1 = 4.1 \text{ mL}$$

- Pengenceran untuk 0.04 M

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$0.4.V1 = 0.04.100$$

$$V1 = 1 \text{ mL}$$

- Pengenceran untuk 0.08 M

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$0.4.V1 = 0.08.100$$

$$V1 = 2 \text{ mL}$$

- Pengenceran untuk 0.12 M

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$0.4.V1 = 0.12.100$$

$$V1 = 3 \text{ mL}$$

- Pengenceran untuk 0.16 M

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$0.4.V1 = 0.16.10$$

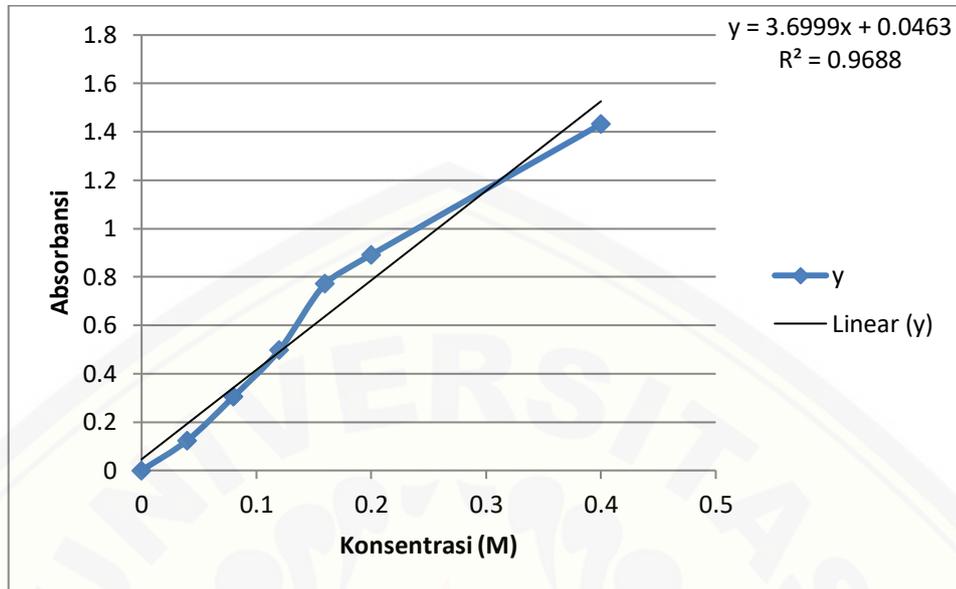
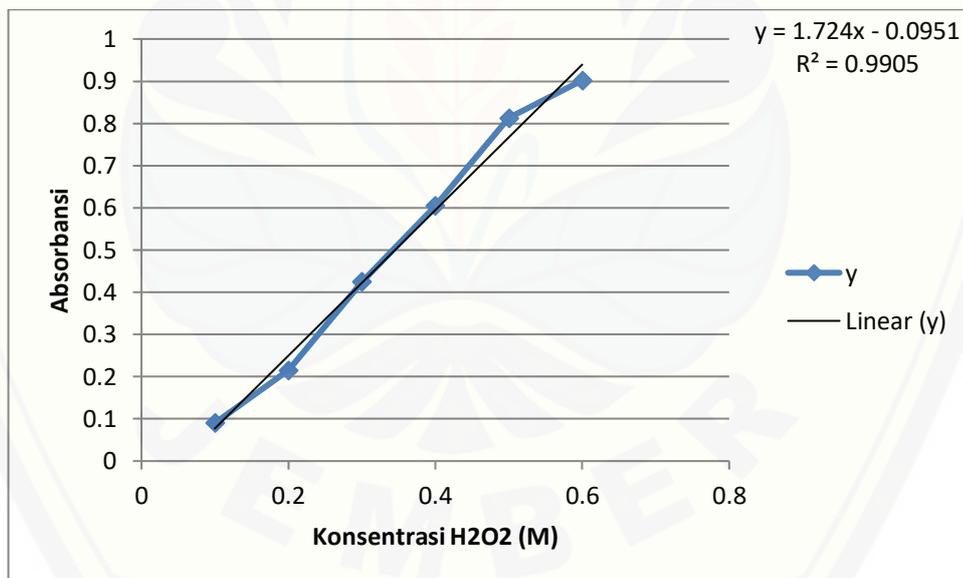
$$V1 = 4 \text{ mL}$$

- Pengenceran untuk 0.2 M

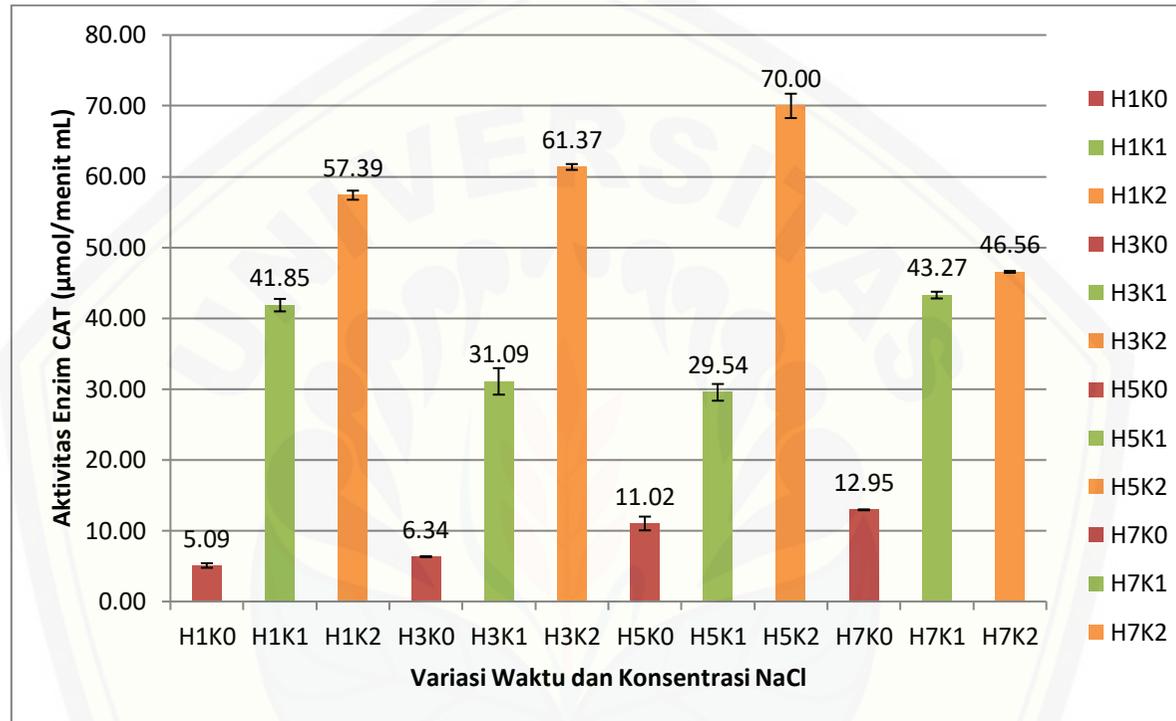
$$M1.V1 = M2.V2$$

$$0.4.V1 = 0.2.10$$

$$V1 = 5 \text{ mL}$$

Lampiran 3.6 Kurva Standar H₂O₂ ($\lambda = 570 \text{ nm}$)Lampiran 3.7 Kurva Standar H₂O₂ ($\lambda = 270 \text{ nm}$)

Lampiran 3.8 Grafik dan Tabel Aktivitas Enzim CAT



HariKonsentrasi	Absorbansi			Aktivitas Enzim CAT ($\mu\text{mol/mLmenit}$)			Rata-Rata Aktivitas Enzim CAT	Standar Deviasi
	U1	U2	U3	U1	U2	U3		
H1K0	0.132	0.122	0.125	5.45	4.81	5.00	5.09	0.33
H1K1	0.775	0.792	0.787	40.88	42.60	42.09	41.85	0.88
H1K2	1.023	1.031	1.033	56.65	57.79	57.73	57.39	0.64
H3K0	0.145	0.146	0.147	6.27	6.34	6.40	6.34	0.06
H3K1	0.602	0.641	0.662	29.05	31.47	32.74	31.09	1.87
H3K2	1.115	1.114	1.105	61.67	61.54	60.91	61.37	0.41
H5K0	0.203	0.223	0.233	9.96	11.23	11.87	11.02	0.97
H5K1	0.687	0.686	0.68	30.77	29.44	28.42	29.54	1.18
H5K2	1.332	1.298	1.332	71.78	68.34	69.87	70.00	1.72
H7K0	0.251	0.249	0.25	13.01	12.89	12.95	12.95	0.06
H7K1	0.923	0.934	0.935	42.72	43.55	43.55	43.27	0.48
H7K2	0.985	0.982	0.98	46.66	46.60	46.41	46.56	0.13

H0K0	0.102	0.099	0.099
------	-------	-------	-------

$$\text{Aktivitas enzim/A.E (U/ml)} = \frac{([S]-[K]) \times Fp \times \frac{V_t}{V_e}}{t \times BM_{H_2O_2}}$$

dimana,

[S] : konsentrasi sampel (mg/ml)

[K] : konsentrasi kontrol (mg/ml)

Fp : faktor pengenceran

V_t : volumet total (μ l)

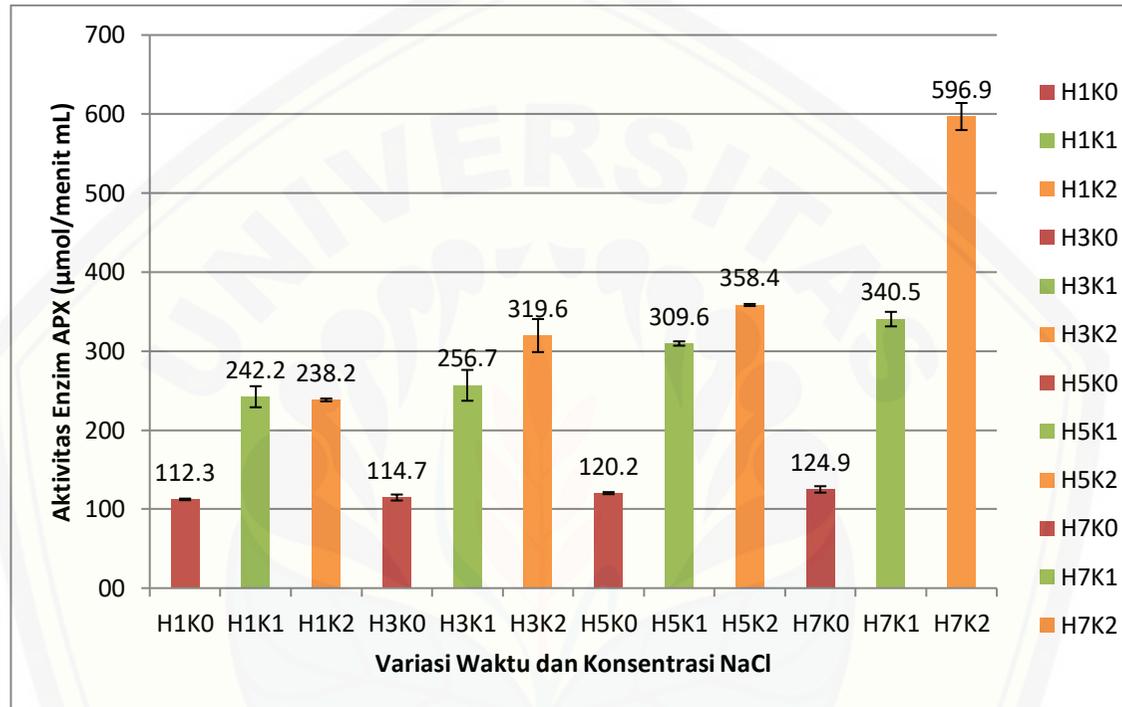
V_e : volume enzim yang digunakan ketika pengukuran (μ l)

t : waktu inkubasi enzim (menit)

BM : berat molekul H_2O_2 (g/mol)

$$\begin{aligned} \text{A.E} &= \frac{([S]-[K]) \times Fp \times \frac{4000 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l}}}{5 \text{ menit} \times 34.01 \text{ g.mol}^{-1}} \\ &= \frac{(TGP \text{ mg/mL}) \times Fp \times 40 \text{ mol}}{170.05 \text{ menit.g}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^{-3} \text{ mg}} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} \\ &= \frac{TGP \times Fp \times 40 \times 10^3 \mu\text{mol}}{170.05 \text{ menit.ml}} = \frac{TGP \times Fp \times 40 \times 10^3 U}{170.05 \text{ ml}} \end{aligned}$$

Lampiran 3.9 Grafik dan Tabel Aktivitas Enzim APX



Hari(H)Konsentrasi(K)	Absorbansi			Aktivitas Enzim APX ($\mu\text{mol/mLmenit}$)			Rata-Rata Aktivitas Enzim APX	Standar Deviasi
	U1	U2	U3	U1	U2	U3		
H1K0	0.122	0.125	0.127	111.1	112.9	112.9	112.3	1.02
H1K1	0.685	0.588	0.582	257.5	236.4	232.8	242.2	13.34
H1K2	0.592	0.591	0.678	239.9	238.2	236.4	238.2	1.75
H3K0	0.132	0.12	0.134	116.4	110.3	117.3	114.7	3.81
H3K1	0.592	0.652	0.65	234.6	271.7	263.7	256.7	19.52
H3K2	0.782	0.698	0.784	331.7	295.5	331.7	319.6	20.90
H5K0	0.143	0.138	0.14	121.7	119.1	119.9	120.2	1.33
H5K1	0.754	0.743	0.74	312.3	309.6	306.9	309.6	2.70
H5K2	0.841	0.841	0.839	357.2	359.8	358.1	358.4	1.32
H7K0	0.158	0.145	0.146	129.6	122.6	122.6	124.9	4.04
H7K1	0.803	0.823	0.819	329.9	346.6	344.9	340.5	9.19
H7K2	1.309	1.350	1.290	588.4	616.6	585.7	596.9	17.11

H0K0	0.102	0.105	0.102
------	-------	-------	-------

$$\text{Aktivitas enzim/A.E (U/ml)} = \frac{([S]-[K]) \times Fp \times \frac{Vt}{Ve}}{t \times BM \ H2O2}$$

dimana,

[S] : konsentrasi sampel (mg/ml)

[K] : konsentrasi kontrol (mg/ml)

F_p : faktor pengenceran

V_t : volumet total (μl)

V_e : volume enzim yang digunakan ketika pengukuran (μl)

t : waktu inkubasi enzim (menit)

BM : berat molekul H_2O_2 (g/mol)

$$\begin{aligned} \text{A.E} &= \frac{([S]-[K]) \times F_p \times \frac{3000 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l}}}{1 \text{ menit} \times 34.01 \text{ g.mol}^{-1}} \\ &= \frac{(TGP \text{ mg/mL}) \times F_p \times 30 \text{ mol}}{34.01 \text{ menit.g}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^{-3} \text{ mg}} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} \\ &= \frac{TGP \times F_p \times 30 \times 10^3 \mu\text{mol}}{34.01 \text{ menit.ml}} = \frac{TGP \times F_p \times 27 \times 10^3 U}{34.01 \text{ ml}} \end{aligned}$$