

## Induksi *Polyethylene Glycol* (PEG) terhadap Karakter Superoxide Dismutase (SOD) pada Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

### *Induction Polyethylene Glycol (PEG) to the Character of Superoxide Dismutase (SOD) in Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)*

Ria Mahasiwi Nathania<sup>1</sup>, Didik Pudji Restanto<sup>1</sup> dan Tri Agus Siswoyo<sup>1\*</sup>

NEJ)

#### ABSTRACT

Drought stress is one of the environmental factors that can lead to the inhibition of the growth of morphologically, physiologically and biochemically, it also causes oxidative stress namely an environmental situation that has increased Reactive Oxygen Species (ROS) due to an over-reduction of the process of photosynthesis and can disrupt the character of cells. It can trigger the formation of the antioxidant defense system that is enzymatic antioxidant such as superoxide dismutase (SOD) which is capable of changing free radicals into harmless compounds. Melinjo plants (*Gnetum gnemon* L.) is a plant that is responsive to environmental changing conditions to grow and has been known to contain antioxidant compounds for defense against free radicals. This study aims to determine the effect of induction of polyethylene glycol (PEG) to the character of superoxide dismutase (SOD) in melinjo seed with different ages. This study uses a completely randomized design (CRD) factorial with two factors, namely the concentration of PEG 0% and 15%, second factor melinjo seeds age 1,2,3 and 4 months. Three parameter observed consist total soluble protein, SDS- PAGE and the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD). The results showed that at the age of 1 month seedlings (A1) with 15% PEG treatment showed total soluble protein content highest at 32.05 mg / g. Ribbon pattern of protein with 15% PEG treatment on seedling age 1,2,3 and 4 months had a band thicker than the PEG treatment 0%. The highest superoxide dismutase enzyme activity shown in seedling age 3 months (A3) with PEG treatment 0% i.e 1.36 units / mg protein.

**Keywords:** Melinjo, polyethylene glycol, drought stress, ROS, SOD, SDS-PAGE.

#### ABSTRAK

Cekaman kekeringan merupakan salah satu faktor lingkungan yang dapat memicu terjadinya penghambatan pertumbuhan secara morfologis, fisiologis dan biokimia, selain itu juga memicu terjadinya cekaman oksidatif yaitu suatu keadaan lingkungan yang mengalami peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat adanya suatu over-reduksi dari proses fotosintesis dan dapat mengganggu karakter sel. Hal ini dapat memicu pembentukan sistem pertahanan berupa antioksidan yang bersifat enzimatik seperti superoxide dismutase (SOD) yang mampu mengubah radikal bebas menjadi senyawa yang tidak berbahaya. Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan tanaman yang responsif terhadap perubahan kondisi lingkungan tumbuh dan telah diketahui mengandung senyawa antioksidan untuk pertahanan terhadap radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh induksi *polyethylene Glycol* (PEG) terhadap karakter superoxide dismutase (SOD) pada bibit melinjo dengan umur berbeda. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor yaitu konsentrasi PEG 0% dan 15%, faktor kedua bibit melinjo umur 1,2,3 dan 4 bulan yang terdiri dari 3 ulangan. Parameter yang diamati total protein terlarut, SDS-PAGE dan aktivitas enzim superoxide dismutase (SOD). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada umur bibit 1 bulan (A1) dengan perlakuan PEG 15% menunjukkan kandungan total protein terlarut paling tinggi yakni 32.05 mg/g BB. Pita pola protein dengan perlakuan PEG 15% pada umur bibit 1,2,3 dan 4 bulan memiliki pita yang lebih tebal dibandingkan dengan perlakuan PEG 0%. Aktivitas enzim superoxide dismutase tertinggi ditunjukkan pada umur bibit 3 bulan (A3) dengan perlakuan PEG 0% yakni 1.36 unit/mg protein

**Kata kunci:** Melinjo, polyethylene glycol, cekaman kekeringan, ROS, SOD, SDS-PAGE.

**How to cite:** Nathania, R.M., Siswoyo, T. A., Restanto, D.P. 2015. Induksi *Polyethylene Glycol* (PEG) terhadap Karakter Superoxide Dismutase (SOD) pada Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

#### PENDAHULUAN

Kondisi kekeringan merupakan salah satu faktor lingkungan yang menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman serta produktivitasnya. Menurut Winarno (1991), tanaman yang kekurangan air dapat mengakibatkan adanya perubahan pada tingkat molekuler, seluler, fisiologi dan morfologi. Perubahan-perubahan yang terjadi berupa penurunan laju pertumbuhan, penurunan luas daun, penurunan volume sel, terjadi penebalan daun, terdapat rambut pada bagian daun, adanya perubahan ekspresi gen, terjadi perubahan metabolisme karbon dan nitrogen, perubahan produksi dan aktivitas enzim serta hormon, sensitivitas stomata yang meningkat dan penurunan laju fotosintesis.

Penyebab terjadinya perubahan pada tanaman dikarenakan sebagian stomata daun menutup sehingga CO<sub>2</sub> yang akan masuk

terhambat dan terjadi penurunan aktivitas fotosintesis. Cekaman kekeringan ini juga dapat memicu terjadinya cekaman oksidatif yakni suatu keadaan lingkungan yang mengalami peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat adanya suatu over-reduksi dari proses fotosintesis. Hal ini terjadi dikarenakan senyawa reduktan yang tidak termanfaatkan akibat CO<sub>2</sub> yang terhambat selama terjadinya proses cekaman kekeringan (Borsani *et al.*, 2001). Proses fotosintesis sangat penting bagi tanaman untuk mempertahankan pertumbuhan dan perkembangan tanaman produksi (Li *et al.*, 2006).

Sharma *et al.*, (2012) menyatakan bahwa peningkatan ROS berupa radikal bebas seperti anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), molekul radikal (OH), serta non radikal hidroksil seperti hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dan oksigen singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) dapat mengganggu

karakter sel, karena mampu bereaksi dengan komponen - komponen yang ada baik secara struktural maupun fungsional (Papas, 1999). Peningkatan ROS yang bersifat radikal bebas dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara ROS tersebut dan status antioksidan yang ada di dalam tanaman (Winarsi *et al.*, 2012). Hal ini dapat memicu pembentukan sistem pertahanan berupa antioksidan yang secara alami terdapat dalam tanaman.

Antioksidan adalah suatu molekul yang dapat menghambat proses oksidasi molekul lainnya (Droge, 2002). Tanaman memiliki sistem pertahanan dari beberapa jenis antioksidan enzimatis antara lain superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT) (Khalimi *et al.*, 2012). Enzim merupakan protein yang berperan sebagai biokatalis dan berperan penting dalam siklus hidup tanaman. Menurut Widowati (2005), superoksida dismutase (SOD) mampu melindungi sel dengan mengubah radikal bebas berupa anion superoksida ( $O_2^-$ ) berbahaya menjadi unsur yang lebih seimbang seperti  $H_2O_2$ . Dengan demikian, enzim-enzim ini mampu melindungi sel dan melawan kerusakan akibat adanya radikal bebas.

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon L.*) merupakan tanaman yang mengandung antioksidan cukup tinggi. Ekstrak pada biji, daun, dan kulit biji dari tanaman ini telah diketahui mengandung senyawa untuk pertahanan terhadap radikal bebas (Siswoyo *et al.*, 2013). Penelitian ini dilakukan dengan melakukan penginduksian *polyethylene glycol* (PEG) pada tanaman melinjo yang merupakan suatu permodelan untuk membentuk kondisi tanaman yang mengalami cekaman kekeringan sehingga dapat memicu peningkatan produksi ROS dan dapat menganalisis karakter dari SOD.

Pemanfaatan PEG sebagai agen osmotikum lebih unggul dibandingkan agen osmotikum yang lain sebab tidak dapat diserap oleh sel akar (Chazen and Neumann, 1994), tidak bersifat toksik bagi tanaman (Verslues *et al.*, 1998) dan dapat menurunkan potensial osmotik larutan. Konsentrasi larutan PEG 6000 sebesar 5–20% diharapkan mampu menciptakan potensial osmotik yang setara dengan kondisi tanah kapasitas lapang. Tanah dalam kondisi kapasitas lapang mempunyai potensial osmotik 0,33 bar (Michel and Kaufmann, 1973).

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui respon pada bibit melinjo (*Gnetum gnemon L.*) melalui kandungan total protein terlarut dan karakter SOD yang mengalami peningkatan ROS akibat adanya induksi PEG sebagai simulasi cekaman kekeringan.

## BAHAN DAN METODE

Percobaan dilaksanakan di *Green house* Fakultas Pertanian dan *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember pada bulan Juli 2014 sampai dengan April 2015. Pelaksanaan percobaan dilakukan dengan beberapa tahap meliputi :

### Pembuatan Media Tanam

Langkah awal yang dilakukan yakni dengan mencampurkan bahan media tanam berupa pasir, tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1:1. Kemudian memasukkan campuran media tersebut kedalam polibag ukuran  $15 \times 20$  cm sebanyak 1100 g dan melakukan penjemuran selama 1 hari dan mengukur kapasitas lapang pada media tanam.

### Penanaman dan Penginduksian PEG-6000

Bibit tanaman melinjo yang digunakan merupakan hasil tanaman transplanting yang telah ditumbuhkan pada beberapa variasi umur yaitu umur 1, 2, 3 dan 4 bulan serta dilakukan pengadaptasian selama 1 bulan. Perawatan yang dilakukan selama proses adaptasi yakni dengan penyiraman setiap 2 hari sekali. Apabila masa adaptasi berakhir maka dilakukan induksi PEG 0%

dan 15% selama 8 hari. Pengaplikasian PEG dilakukan dengan penimbangan sesuai kapasitas lapang dahulu, kemudian selama masa penginduksian, larutan PEG disiram pada media tanam sesuai dengan jumlah kehilangan air pada tanaman tersebut sehingga tanaman tetap dalam kondisi kapasitas lapang sekitar 10-40 ml.

### Pengukuran Total Protein Terlarut

Sampel daun melinjo diambil sebanyak 0,5 gram kemudian digerus dan ditambah dengan 3x buffer fosfat. Sampel yang telah halus dimasukkan ke dalam mikrotube dan disentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Analisis kandungan total protein terlarut dilakukan sesuai dengan metode Bradford (1970), yakni supernatan diambil sebanyak 5  $\mu$ l dan ditambah dengan 45  $\mu$ l aquadest serta 950  $\mu$ l larutan Bradford dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

### Pengujian Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD)

Pengujian SOD dilakukan berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Marklund dan Marklund (1974), uji aktivitas SOD dilakukan dengan metode autoksidasi pyrogallol. Secara singkat, 50 mM Tris-HCl buffer pH 8,2 dengan 1 mM EDTA digunakan sebagai media reaksi kemudian ditambahkan 40 ~ 60 mg protein ekstrak sampel dan mencampurkan 100  $\mu$ l 0,2 mM pirogallol (dilarutkan dalam 50 mM PPB pH 6,5) untuk memulai reaksi, dan penurunan absorbansi pyrogallol dipantau di 420 nm.

### Induksi *polyethylene glycol* (PEG) terhadap karakter superoxide dismutase (SOD) pada melinjo (*Gnetum gnemon L.*)

dilakukan dengan metode percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor yaitu yakni konsentrasi PEG dan beda umur tanaman yang diaplikasikan pada masing-masing tanaman, tiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Adapun perlakuan yang digunakan dalam percobaan ini yaitu:

Faktor I adalah perlakuan konsentrasi PEG, meliputi:

K0 : PEG 0%

K1 : PEG 15%

Faktor II perlakuan beda umur bibit melinjo, meliputi:

A1: Bibit umur 1 bulan

A2: Bibit umur 2 bulan

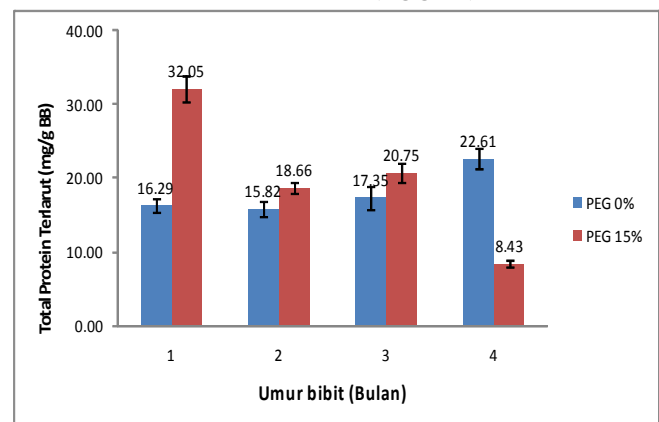
A3: Bibit umur 3 bulan

A4: Bibit umur 4 bulan

Data hasil perlakuan dianalisis menggunakan sidik ragam dan jika terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf ketidakpercayaan 5%.

## HASIL

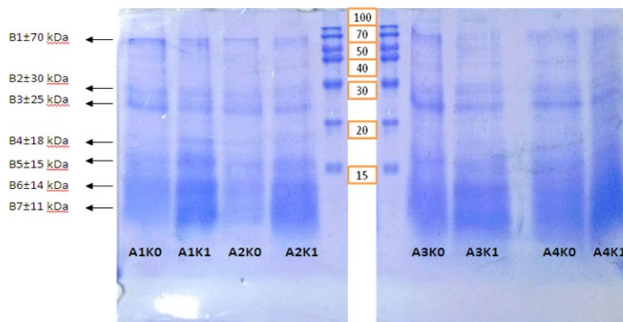
Gambar 1. Total Protein Terlarut (mg/g BB)



Berdasarkan grafik tersebut menunjukkan bahwa umur bibit 1,2 dan 3 bulan dengan perlakuan PEG 15% memiliki total protein terlarut lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan PEG

0%. Sedangkan pada umur bibit 4 bulan dengan perlakuan PEG 15% lebih rendah dibandingkan perlakuan PEG 0%. Total protein terlarut paling tinggi ditunjukkan pada umur bibit 1 bulan dengan perlakuan PEG 15% yakni 32.05 mg/g BB.

**Gambar 2. SDS-PAGE (Pola Pita Protein (kDa))**



**Keterangan :**

A1K0 = umur 1 bulan perlakuan PEG 0%  
 A1K1 = umur 1 bulan perlakuan PEG 15%  
 A2K0 = umur 2 bulan perlakuan PEG 0%  
 A2K1 = umur 2 bulan perlakuan PEG 15%  
 A3K0 = umur 3 bulan perlakuan PEG 0%  
 A3K1 = umur 3 bulan perlakuan PEG 15%  
 A4K0 = umur 4 bulan perlakuan PEG 0%  
 A4K1 = umur 4 bulan perlakuan PEG 15%

B1 = Band 1  
 B2 = Band 2  
 B3 = Band 3  
 B4 = Band 4  
 B5 = Band 5  
 B6 = Band 6  
 B7 = Band 7

Berdasarkan gambar tersebut menunjukkan bahwa pita pada umur bibit 1,2,3 dan 4 bulan menunjukkan bahwa perlakuan PEG 15% memiliki pola pita yang lebih tebal dibandingkan dengan perlakuan PEG 0%. Berat molekul pada pola protein dari daun melinjo dengan perlakuan PEG 0% dan PEG 15% yaitu band 1 memiliki berat molekul  $\pm 70$  kDa, band 2 memiliki berat molekul  $\pm 30$  kDa, band 3 memiliki berat molekul  $\pm 25$  kDa, band 4 memiliki berat molekul  $\pm 18$  kDa, band 5 memiliki berat molekul  $\pm 15$  kDa, band 6 memiliki berat molekul  $\pm 14$  kDa, band 7 memiliki berat molekul  $\pm 11$  kDa.

**Tabel 1. Pengaruh Perlakuan PEG (0% dan 15%) dan Bada Umur Bibit Terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (unit/mg protein)**

| PEG      | Umur bibit   |               |               |              |
|----------|--------------|---------------|---------------|--------------|
|          | A1 (1 bulan) | A2 (2 bulan)  | A3 (3 bulan)  | A4 (4 bulan) |
| K0 (0%)  | 0.94a<br>(A) | 0.23a<br>(B)  | 1.36a<br>(BC) | 0.77a<br>(D) |
| K1 (15%) | 0.95b<br>(A) | 1.17b<br>(AB) | 1.04b<br>(BC) | 1.31b<br>(D) |

Keterangan : Angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%, huruf kecil tanpa kurung dibaca secara vertikal yang menunjukkan perbandingan antar konsentrasi PEG (K0 dan K1), sedangkan huruf kapital dalam kurung dibaca secara horizontal yang menunjukkan perbandingan antar umur bibit (A1, A2, A3 dan A4).

Berdasarkan **Tabel 1** menunjukkan bahwa pemberian PEG sesuai dengan perlakuan PEG 0% (K0) dan 15% (K1) pada masing-masing umur tanaman terdapat aktivitas dari enzim superoksida dismutase yang berbeda nyata. Rata-rata aktivitas enzim dengan perlakuan PEG 15% (K1) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan PEG 0%. Namun pada umur bibit 3 bulan dengan perlakuan PEG 0% menunjukkan kativitas yang paling tinggi yakni 1.36 unit/mg protein.

## PEMBAHASAN

### Total Protein Terlarut

Protein merupakan salah satu senyawa metabolit yang dihasilkan oleh tanaman dan memiliki peran yang sangat penting dalam siklus hidup tanaman. Menurut Muller dan Whitsitt (1996) menyatakan bahwa tanaman yang mengalami cekaman kekeringan akan menunjukkan respon pada tingkat seluler dan molekuler seperti perubahan metabolisme karbon dan nitrogen, perubahan akumulasi senyawa metabolisme osmotik terlarut dan sebagai respon secara molekuler terjadi perubahan ekspresi gen. Tanaman yang mengalami cekaman kekeringan akan membentuk mekanisme penyesuaian osmotik yakni dengan perubahan giula osmotik berupa gula silosa dan selanjutnya akan terinduksi protein yang memiliki berat molekul rendah serta akumulasi prolin (Wijana, 2001).

Umur bibit 1, 2 dan 3 bulan menunjukkan terjadinya peningkatan total protein terlarut, hal ini berkaitan dengan respon tanaman yang beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang mengalami cekaman kekeringan. Tanaman akan melakukan perubahan metabolisme yang lebih mengarah pada regulasi antioksidan enzimatik yang disertai dengan akumulasi protein pelindung. Peningkatan akumulasi protein pelindung ini menyebabkan total protein terlarut yang ada dalam tanaman juga mengalami peningkatan. Pengakumulasian kandungan total protein juga merupakan bentuk pertahanan tanaman yang mengalami cekaman kekeringan (Chkhubianishvili *et al.*, 2011). Pada umur bibit 4 bulan dengan perlakuan PEG 15% menunjukkan penurunan total protein, hal ini disebabkan tanaman yang mengalami cekaman kekeringan mengalami penurunan sintesis protein dari prolin namun proteolisis protein menjadi prolin berlangsung tetap sehingga menyebabkan kadar protein menurun.

### SDS-PAGE (Pola Pita Protein)

SDS-PAGE atau Elektroforesis gel poliakrilamida-Sodium Dodesil Sulfat adalah teknik elektroforesis gel yang menggunakan poliakrilamida untuk memisahkan protein yang bermuatan berdasarkan berat molekulnya. Pola pita yang nampak disebabkan proses denaturasi protein sehingga molekul protein dapat terpisah-pisah dan membeuk monomer-monomer (Salisbury and Ross, 1992). Menurut Na'im (1996 dalam Yunus, 2007) menyatakan bahwa ada atau tidaknya pita pada jarak perpindahan tertentu menunjukkan ada atau tidaknya protein yang termigrasi dan berhenti pada jarak tersebut selama proses elektroforesis. Tingkat ketebalan pita ada dua macam yakni tebal dan tipis. Pita yang tebal menunjukkan bahwa kandungan atau konsentrasi proteinnya banyak sedangkan pita yang tipis menunjukkan kandungan atau konsentrasinya sedikit. Perbedaan tebal dan tipisnya pita yang terbentuk disebabkan karena perbedaan jumlah dari molekul-molekul yang termigrasi, pita tebal merupakan fiksasi dari beberapa pita. Pita yang memiliki kekuatan ionik lebih besar akan termigrasi lebih jauh daripada pita yang berkekuatan ionik kecil (Cahyarini, 2004).

Pola pita protein pada bibit melinjo menunjukkan perlakuan PEG 15% yang paling tebal dibandingkan perlakuan 0% dan terbentuk 7 pola pita protein. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman yang mengalami cekaman kekeringan akan mengakumulasi kandungan protein sehingga meningkat kandungan protein terlarut. Selama proses elektroforesis berlangsung akan memecah molekul protein menjadi monomer. Semakin banyak kandungan protein terlarut maka semakin banyak pula protein yang terpecah-pecah sehingga memunculkan pita protein yang tebal.

### Pengaruh Perlakuan PEG (0% dan 15%) dan Bada Umur Bibit Terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase

Menurut Alscher (1989), munculnya radikal bebas akibat cekaman kekeringan memicu tanaman untuk memiliki mekanisme perlindungan berupa antioksidan enzimatis maupun non enzimatis untuk pertahanan melawan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang salah satunya adalah superoksida anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Halliwell, 1999). Setiap sel memiliki antioksidan alami sebagai perlindungan dari adanya radikal bebas, namun apabila kuantitas radikal bebas melebihi kemampuan pertahanan antioksidan dapat mengganggu jaringan oksidatif atau yang disebut dengan stress oksidatif (Wuryastuti, 2000). Anion superoksida yang dihasilkan dapat diubah oleh enzim superoksida dismutase (Widowati *et al.*, 2005). Diduga bahwa pada kondisi tanaman mengalami cekaman kekeringan, akan terjadi peningkatan produksi ROS berupa anion superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ) dan juga terjadi peningkatan antioksidan enzimatis yaitu superoksida dismutase yang berperan sebagai peredam radikal bebas tersebut. Peningkatan asupan antioksidan yang mampu menjaga pertahanan terhadap radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya keseimbangan antara oksidan dan antioksidan (Suryanto dan Wehentouw, 2009).

### KESIMPULAN

Kesimpulan dari percobaan ini adalah pemberian PEG konsentrasi 15% pada umur bibit 1 bulan (A1) menunjukkan kandungan total protein terlarut paling tinggi yakni 32.05 mg/g BB dan menunjukkan pola pita protein yang paling tebal. Pada aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) yang tertinggi ditunjukkan pada umur bibit 3 bulan dengan perlakuan konsentrasi PEG 0% (K0) yakni 1.36 unit/mg protein

### UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada KEMENRISTEK 2014 yang telah mendanai penelitian ini a.n Prof. Tri Agus Siswoyo, Ph.D.

### DAFTAR PUSTAKA

- Alscher RG. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant*, 77 : 457-464.
- Borsani O, P Diaz, MF Agius, V Valpuesta, J Monza. 2001. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leave. *Plant Sci.*, 161 : 757-763.
- Cahyarini RD. 2004. *Identifikasi Keragaman Genetik Beberapa Varietas Kedelai Jawa Berdasarkan Analisis Isozim*. Thesis Master yang tidak dipublikasikan, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Chazen O, PM Neumann. 1994. Hydraulic signals from the roots and rapid cell wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. *Plant Physiol.*, 104 : 1385-1392.
- Chkhubianishvili, Kacharava, Badridze, Chanishvili, 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.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, 82:47-95.
- Halliwell B, JMC Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, UK.
- Khalimi K, DN Suprpta, Y Nitta. 2012. Effect of *pantoea agglomerans* on growth promotion and yield of rice. *Agricultural Science Research Journals*, 2(5) : 240-249.
- Li R, P Guo, M Baum, S Grando, S Ceccarelli. 2006. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China*, 5(10) : 751-757.
- Marklund S, G Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47 : 469-474.
- Michel BE, MR Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol*, 51 : 914-916.
- Muller JE, MS Whitsitt. 1996. Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Reg.*, 20 : 119 – 124.
- Papas AM. 1999. *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*. CRC Press, Washington, D.C.
- Salisbury FB, CW Ross. 1992. *Plant Physiology*. 4rd Ed. Wadsworth Publishing Company, California.
- Sharma P, A Jha, R Dubey, M Pesarakli. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Botany*, 1-26.
- Siswoyo TA, A Madlos, H Kelzo. 2013. Free radical scavenging activity and DNA damage protective effect of melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Medicinal Plants Research*, 7(32) : 2399-2406.
- Suryanto E, F Wehentouw. 2009. Aktivitas penangkap radikal bebas dari ekstrak fenolik daun sukun (*Artocarpus altilis* F.). *Chem. Prog.*, 2(1) : 1-7.
- Verslues PE, ES Obes, RE Sharp. 1998. Root growth and oxygen relation at low water potential impact of oxygen availability in *polyethylene glycol* solution. *Plant Physiol*, 116 : 1.403-1.412.
- Widowati W, R Safitri, R Rumumpuk, M Siahaan. 2005. Penapisan aktivitas superoksida dismutase pada berbagai tanaman. *JKM*, 5(1) : 33-48.
- Wijana G. 2001. *Analisis Fisiologi, Biokimia dan Molekuler Sifat Toleran Tanaman Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.) terhadap Cekaman Kekeringan*. Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor. (Disertasi tidak dipublikasikan).
- Winarno FG. 1991. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Winarsi H. 2012. Aktivitas enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutatoin peroksidase wanita penderita sindrom metabolik. *MKB*, 44 (1) : 7-12.
- Wuryastuti H. 2000. *Stres Oksidatif dan Implikasinya terhadap Kesehatan*. Pidato Pengukuhan Guru Besar UGM, Yogyakarta.
- Yunus A. 2007. Studi morfologi dan isozim jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) sebagai bahan baku energi terbarukan di jawa tengah. *Enviro*, 9(1) : 73 – 82.

