



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

SKRIPSI

Oleh :

Ria Mahasiwi Nathania

101510501166

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



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

SKRIPSI

Oleh:

**Ria Mahasiwi Nathania
101510501166**

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



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

LAPORAN

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian

Oleh:

**Ria Mahasiwi Nathania
101510501166**

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

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Bapak saya tercinta Sugeng Budi Hartoyo dan Mama saya tercinta Sri Winarsih yang telah mencurahkan kasih sayangnya dengan mendukung dan mendoakan serta memberikan semangat yang luar biasa kepada penulis.
2. Semua sahabat-sahabat yang selalu menemani, mendoakan dan member semangat kepada penulis.
3. Semua guru – guru sejak Sekolah Dasar hingga Perguruan Tinggi yang telah mendidik dan memberikan ilmunya.
4. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember yang saya banggakan.

MOTTO

There is a will, there is a way

Give everything to God and he will take care of you

Don't be afraid, for I am with you. Don't be discouraged, for I am your God
(Isaiah 41:10)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ria Mahasiwi Nathania

NIM : 101510501166

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: *Induksi Polyethylene Glycol (PEG) terhadap Karakter Superoxide Dismutase (SOD) dan Katalase (CAT) pada Melinjo (Gnetum gnemon L.)* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,
Yang menyatakan,

Ria Mahasiwi Nathania
NIM. 101510501166

SKRIPSI

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

Oleh

Ria Mahasiwi Nathania
101510501166

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama	: Prof. Tri Agus Siswoyo,SP.,M.Agr.,Ph.D. NIP. 19700810 199803 1 001
Dosen Pembimbing Anggota	: Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D. NIP. 19650426 199403 1 001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul: “Induksi *Polyethylene Glycol* (PEG) terhadap Karakter Superoxide Dismutase (SOD) dan Katalase (CAT) pada Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian Universitas Jember pada:

Hari : Rabu

Tanggal : 28 Oktober 2015

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

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

Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D.
NIP. 19650426 199403 1 001

Dosen Penguji,

Dr.Ir. Denna Eriani Munandar, MP.
NIP. 19600409 198802 2 001

**Mengesahkan
Dekan,**

Dr. Ir. Jani Januar, MT.
NIP. 19590102 198803 1 002

RINGKASAN

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 Spesies* (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) dan katalase (CAT) 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 menggunakan bibit tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang diinduksi *polyethylene glycol* (PEG) dengan konsentrasi 0% (K0) dan 15% (K1) yang diaplikasikan pada umur bibit berbeda yakni 1 bulan (A1), 2 bulan (A2), 3 bulan (A3) dan 4 bulan (A4) sebagai suatu permodelan kondisi kekeringan untuk memicu peningkatan produksi ROS, peningkatan ini dijadikan dasar analisis aktivitas enzim antioksidan berupa superoxide dismutase (SOD) dan katalase (CAT). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada umur bibit 1 bulan (A1) dengan perlakuan PEG 15% (K1) terjadi peningkatan radikal bebas yang ditunjukkan pada penangkapan anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) sebesar 41% dan penangkapan hidrogen peroksida (H_2O_2) sebesar 71.61%. Aktivitas enzim superoksida dismutase yang tertinggi ditunjukkan pada umur bibit 3 bulan (A3) dengan perlakuan konsentrasi PEG 0% (K0) yakni 1.36 unit/mg protein sedangkan aktivitas enzim katalase tertinggi ditunjukkan pada umur bibit 1 bulan (A1) dengan perlakuan konsentrasi PEG 15% (K1) yakni 2.87 unit/mg protein.

SUMMARY

Drought is one of the environmental factors that can lead to the inhibition of the growth morphologically, physiologically and biochemically. It also trigger stress oxidative 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 in the form that is enzymatically such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), which is able to convert free radicals into harmless compounds. Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) is a plant that is responsive to changing environmental conditions to grow and has been known to contain antioxidant compounds against free radicals.

This study uses crop seeds melinjo (*Gnetum gnemon* L.) induced by polyethylene glycol (PEG) with a concentration of 0% (K0) and 15% (K1) which is applied at the different ages seedlings 1 month (A1), 2 months (A2), 3 months (A3) and 4 months (A4) as a modeling drought conditions to trigger ROS increase production, this increase is used as the basis of analysis of activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The results showed that at the age of 1 month seedlings (A1) with 15% PEG treatment (K1) an increase in free radicals, which are shown in the capture of superoxide anion (O_2^-) by 41% and the arrest of hydrogen peroxide (H_2O_2) amounted to 71.61%. The activity of the enzyme superoxide dismutase highest shown in seedling age 3 months (A3) by treatment with PEG 0% (K0) which is 1.36 units/mg protein whereas the activity of catalase enzyme highest shown in seedling age 1 month (A1) by treatment with PEG 15% (K1) which is 2.87 units/mg protein.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat limpahan kasih dan anugerahNya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini dengan judul “Induksi *Polyethylene Glycol* (PEG) terhadap Karakter Superoxide Dismutase (SOD) dan Katalase (CAT) pada Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)” yang merupakan salah satu prasyarat untuk mencapai strata satu (S1) pada Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Dr. Ir. Jani Januar, MT. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember dan Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC selaku Ketua Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP.,M.Agr.,Ph.D selaku dosen pembimbing utama, yang telah dengan ikhlas membimbing, mendidik dan memberikan ilmu yang bermanfaat serta motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
3. Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D selaku dosen pembimbing anggota yang telah bersedia meluangkan waktu dan tenaga untuk membimbing dan memberikan ilmu kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
4. Dr.Ir. Denna Eriani Munandar, MP. selaku dosen penguji yang telah bersedia meluangkan waktu dan tenaga untuk membimbing dan menguji penulis dalam menyelesaikan skripsi.
5. Bapak saya Sugeng Budi Hartoyo dan Mama saya Sri Winarsih yang telah mendukung, memberikan doa serta semangat dalam masa menyelesaikan skripsi
6. Sahabat-Sahabat terkasih D’Acid dan Ress yang senantiasa memberikan bantuan dan motivasi kepada penulis yakni Susi Yuliani, Ulil Abror, Nely Rahmawati, Dwi Fitriani, Y. Nuriyah, Sela Reza R., Dede Abdillah, Roni S., Sari Anugrah, Ervina L, Moch. Gufron, dan Yoki P.

7. Sahabat-sahabat Agroteknologi angkatan 2010 Fakultas Pertanian Universitas Jember yang telah banyak membantu dan memotivasi penulis selama masa studi.
8. Keluarga Gyeongsang National University (GNU) Winter Camp 2015 in Jinju, South Korea yakni Aji, Lia, Rifka, Annisa, Febri dan Fandi yang selalu mendukung penulis.
9. Sahabat seperjuangan di Laboratorium Analisis Tanaman Fakultas Pertanian UNEJ dan CDAST yakni Adi, Laras, Roni, Nuriyah, Dede, Bayu, Rio, Robitha, Mbak Biby, Sisil, Lilik dan Jeje yang selalu membantu dan memotivasi penulis.
10. Sahabat-sahabat PERMAKER, Mas Yusuf, Laura dan Kak Kartini yang selalu mendoakan dan membantu penulis.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang memberikan bantuan dan motivasi bagi penulis selama studi sampai penulisan skripsi.

Penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga diharapkan adanya saran dan kritik untuk perbaikan selanjutnya. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi semua pihak, terutama bagi dunia pertanian.

Jember,

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan dan Manfaat	3
1.3.1 Tujuan	3
1.3.2 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	4
2.2 Cekaman Kekeringan.....	4
2.3 Polyethylene Glycol (PEG).....	5
2.4 Reactive Oxygen Spesies (ROS).....	6
2.5 Superoxide Dismutase (SOD) dan Catalase (CAT).....	8
2.6 Hipotesis	9
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	10
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	10

3.2 Bahan dan Alat Percobaan	10
3.2.1 Bahan.....	10
3.2.2 Alat.....	10
3.3 Rancangan Percobaan.....	10
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	11
3.4.1 Pembuatan Media Tanam.....	11
3.4.2 Penanaman dan Penginduksian PEG-6000.....	11
3.4.3 Analisis Kandungan Klorofil Total.....	12
3.4.4 Pengukuran Total Protein Terlarut.....	12
3.4.5 Pengukuran penangkapan superoxide anion (O_2^-) dan hidrogen peroksida (H_2O_2).....	12
3.4.6 Pengujian Aktivitas Enzim SOD dan CAT.....	13
3.5 Parameter Pengamatan	13
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Penangkapan Radikal Bebas Anion Superoksida (O_2^-).....	15
4.2 Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase	16
4.3 Kandungan Hidrogen Peroksida (H_2O_2)	18
4.4 Penangkapan Hidrogen Peroksida (H_2O_2).....	20
4.5 Aktivitas enzim katalase.....	21
4.6 Tinggi Bibit.....	24
4.7 Berat Basah Total.....	25
4.8 Panjang Akar.....	26
4.9 Luas Daun.....	27
4.10 Rasio Akar:Tajuk.....	28
4.11 Kandungan Klorofil Total.....	29
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

No		Halaman
4.1	Pengaruh perlakuan konsentrasi PEG dan beda umur bibit terhadap aktivitas enzim superoksida dismutase.....	17
4.2	Nilai F-Hitung pada parameter pertumbuhan.....	23
4.3	Interaksi Perlakuan PEG (0% dan 15%) dan beda umur bibit terhadap tinggi bibit melinjo.....	24
4.4	Pengaruh umur bibit terhadap berat basah total bibit melinjo.....	25
4.5	Pengaruh pemberian PEG dan beda umur bibit terhadap panjang akar bibit tanaman melinjo.....	26
4.6	Pengaruh pemberian PEG terhadap luas daun bibit melinjo.....	28
4.7	Pengaruh perlakuan PEG (0% dan 15%) dan beda umur bibit terhadap rasio akar:tajuk bibit melinjo.....	29
4.8	Interaksi antara perlakuan konsentrasi PEG dan beda umur bibit terhadap kandungan klorofil total.....	30

DAFTAR GAMBAR

No		Halaman
4.1	Persentase penangkapan radikal bebas superoksida anion (O_2^-).....	16
4.2	Kandungan hidrogen peroksida.....	19
4.3	Persentase penangkapan hidrogen peroksida.....	20
4.4	Pengaruh perlakuan PEG (0% dan 15%) dan beda umur bibit terhadap aktivitas enzim katalase.....	22

DAFTAR LAMPIRAN

No.		Halaman
1.	Lampiran 1 Hasil sidik ragam parameter pertumbuhan.....	38
2.	Lampiran 2 Dokumentasi Pelaksanaan Penelitian	44

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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 CO₂ 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 Spesies* (ROS) akibat adanya suatu over-reduksi dari proses fotosintesis. Hal ini terjadi dikarenakan senyawa reduktan yang tidak dimanfaatkan akibat CO₂ 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 (O₂⁻), molekul radikal (OH), serta non radikal hidroksil seperti hidrogen peroksida (H₂O₂), dan oksigen singlet (¹O₂) 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 antara lain superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT) (Khalimi *et al.*, 2012). 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 . Namun unsur tersebut masih bersifat toksik bagi tanaman sehingga memerlukan CAT yang berperan penting dalam mengubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen. Dengan demikian, enzim-enzim ini mampu melindungi sel dan melawan kerusakan akibat adanya radikal bebas. Kedua enzim tersebut membentuk rangkai perubahan ROS menjadi unsur penyeimbang sehingga sel dapat terlindungi.

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 dan CAT.

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). Pada penelitian pendahuluan, pengaplikasian PEG dilakukan selama 8 hari dengan konsentrasi 0% dan 15%, perlakuan tersebut telah menunjukkan adanya gejala tanaman mengalami cekaman kekeringan.

Berdasarkan umur bibitnya, pertumbuhan bibit melinjo berbeda-beda yakni umur bibit 1 bulan, 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan sehingga digunakan sebagai

perbandingan respon tanaman dan analisis antioksidan enzimatis berupa SOD dan CAT.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh induksi PEG terhadap peningkatan radikal bebas (superoksida anion dan hidrogen peroksida) pada tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang menstimulir pembentukan sistem pertahanan berupa SOD dan CAT sebagai antioksidan enzimatis sehingga dapat mengetahui karakter enzim tersebut berdasarkan umur bibit melinjo yang berbeda yakni umur bibit 1 bulan, 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan.

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan

1. Untuk mengetahui pengaruh PEG terhadap status ROS (O_2^- dan H_2O_2) pada umur bibit yang berbeda yakni 1 bulan 2bulan, 3 bulan dan 4 bulan.
2. Untuk mengetahui karakter SOD dan CAT terhadap perubahan ROS berdasarkan umur bibit yang berbeda yakni 1 bulan 2bulan, 3 bulan dan 4 bulan.

1.3.2 Manfaat

1. Dapat memberikan informasi mengenai status ROS (O_2^- dan H_2O_2) pada umur bibit yang berbeda yakni 1 bulan 2bulan, 3 bulan dan 4 bulan.
2. Dapat memberikan informasi mengenai karakter SOD dan CAT terhadap perubahan ROS berdasarkan umur bibit yang berbeda yakni 1 bulan 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Tanaman melinjo merupakan salah satu tanaman yang tergolong dalam biji terbuka. Melinjo mampu beradaptasi dengan lingkungan yang kurang subur. Kondisi iklim yang sesuai untuk pertumbuhan melinjo yakni lingkungan yang memiliki curah hujan 2.500 – 3.000 mm per tahun dengan ketinggian tempat berkisar antara 400-1.200 m dpl. Tanaman melinjo ini tidak membutuhkan syarat tumbuh khusus sehingga dapat tumbuh dengan baik pada berbagai jenis tanah (Purnomoshidi *et al.*, 2007).

Tanaman melinjo mengandung senyawa-senyawa yang bermanfaat. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, biji melinjo mengandung senyawa polifenol (fenol sederhana, flavonoid, dan tanin), senyawa *gnemonoside* yang merupakan salah satu golongan stilbenoid dan berperan sebagai senyawa antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas serta terdapat senyawa vitamin C dan tokoferol (Santoso *et al.*, 2010).

2.2 Cekaman Kekeringan

Cekaman kekeringan adalah salah satu faktor abiotik yang dapat mempengaruhi produktivitas suatu tanaman sebab hal ini menunjukkan kondisi tanaman yang mengalami kekurangan air (Bray, 1997). Pengaruh nyata dari cekaman ini adalah penurunan potensial air sehingga menyebabkan proses metabolisme tanaman menjadi terhambat (Chaves, 1991). Jika cekaman kekeringan ini terus berlanjut hingga fase generatif maka dampak yang ditimbulkan semakin besar yakni terjadinya senesense bahkan kematian pada tanaman (Neumann, 2008). Menurut Salisbury and Ross (1992), kekeringan yang terjadi pada tanaman dapat mempengaruhi proses morfologi, anatomi, fisiologi dan biokimia. Menurut Ai dan Banyo (2011), respon perubahan tanaman akibat cekaman kekeringan juga ditunjukkan dengan terjadinya penurunan laju pertumbuhan dan peningkatan rasio akar:tajuk tanaman. Apabila hal tersebut

terjadi secara terus-menerus maka menyebabkan perubahan tidak dapat balik dan pada akhirnya tanaman akan mati (Winarno, 1991).

Adanya cekaman kekeringan dapat menginduksi terjadinya cekaman oksidatif dimana cekaman oksidatif ini cukup berbahaya bagi tanaman karena dapat merusak sel-sel yang ada. Namun cekaman oksidatif yang terjadi bukan hanya sebabkan oleh cekaman kekeringan saja tetap juga dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti herbisida (McKersie and Leshem, 1994). Kekeringan merupakan salah satu faktor yang paling signifikan dalam membatasi pertumbuhan tanaman dan produktivitas tanaman (Tas and Tas, 2007). Hal ini berkaitan dengan proses fotosintesis yang terhambat sehingga menyebabkan perubahan bahkan kerusakan komponen-komponen dalam proses fotosintesis (Nayyar and Gupta, 2006). Selain itu, menurut Monakhova dan Chernyadev (2002), hal ini juga dapat menghambat proses fotokimia dan menurunkan aktivitas enzim yang terdapat dalam siklus fotosintesis tersebut.

2.3 Polyethylene Glycol (PEG)

Senyawa osmotikum yang dapat digunakan untuk membentuk kondisi suatu tanaman mengalami cekaman adalah *Polyethylene glycol* (PEG). PEG 6000 telah lama dimanfaatkan sebagai suatu stimulan yang dapat diandalkan dalam pengujian tanaman yang toleran terhadap kekeringan. Hal ini disebabkan PEG merupakan agen osmotikum yang dapat menghambat penyerapan air oleh sistem perakaran tanaman. Selain itu, stres osmotik yang dihasilkan oleh PEG-6000 dapat menurunkan laju fotosintesis (Chutia and Borah, 2012). Penggunaan PEG ini lebih disarankan daripada senyawa osmotikum yang lainnya sebab PEG ini merupakan stimulan yang paling baik untuk mengondisikan tanaman mengalami cekaman kekeringan (Verlues *et al.*, 1998).

Menurut Sumarjan dan Farid (2009), Senyawa osmotikum yang terkandung di dalam PEG, dapat mempengaruhi potensial air pada media tanam, sehingga menstimulir terbentuknya cekaman kekeringan pada media tanam yang digunakan. Penggunaan PEG ini dapat menciptakan kondisi seleksi yang seragam sehingga kesalahan identifikasi berkaitan dengan kepekaan tanaman dapat

diminimumkan. Menurut Versluer *et al.* (2006), mekanisme PEG untuk mengkondisikan tanaman dalam keadaan tercekam yakni dengan mengikat air sehingga air tidak tersedia bagi tanaman. Hal ini terjadi karena adanya kekuatan matriks sub unit etilen atau total massa $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ dalam rantai polimer PEG faktor penting yang mempengaruhi dan mengontrol besar kecilnya potensial air. Molekul air (H_2O) akan tertarik oleh atom O yang terdapat pada sub unit etilen oksida melalui ikatan hidrogen (Michel and Kaufman, 1973).

2.4 Reactive Oxygen Spesies (ROS)

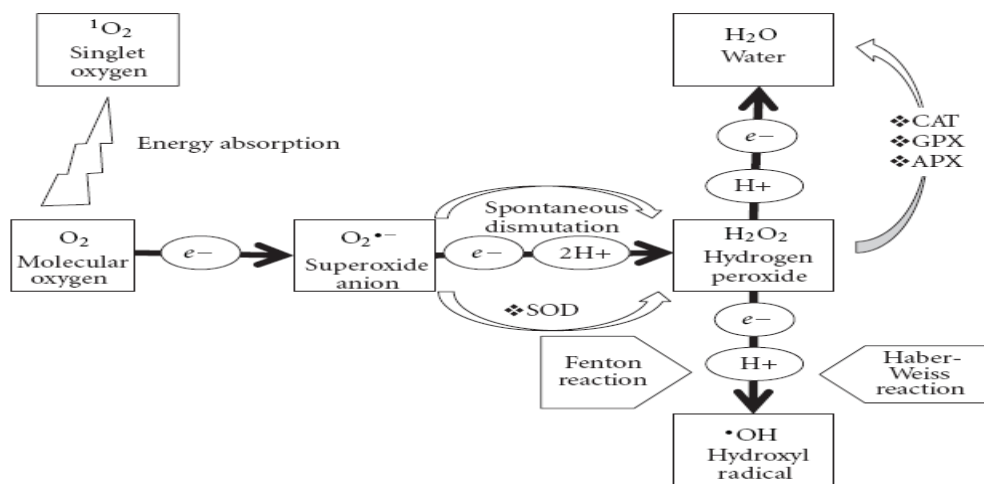
Reactive Oxygen Spesies (ROS) merupakan kelompok radikal bebas, molekul reaktif dan ion yang berasal dari oksigen (O_2). Sekitar 1% oksigen (O_2) yang dikonsumsi oleh tanaman dapat dialihkan untuk menghasilkan ROS di berbagai lokus subselular seperti kloroplas, mitokondria, peroksisom. ROS juga berperan ganda baik sebagai penyebab kerusakan dan bermanfaat tergantung dari konsentrasi yang terdapat tanaman. Pada konsentrasi tinggi ROS penyebab kerusakan biomolekul, sedangkan pada konsentrasi rendah atau sedang bertindak sebagai sinyal intraseluler yang memediasi beberapa tanggapan dalam sel tanaman (Sharma *et al.*, 2012).

Asam absisat merupakan pusat respon terhadap cekaman kekeringan karena dapat merangsang penutupan stomata sehingga air yang hilang dapat diminimalisir. Namun hal ini menyebabkan terbatasnya proses fiksasi CO_2 yang berdampak negatif bagi tanaman karena berpengaruh terhadap peningkatan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) berupa O_2^- (anion superoksida), H_2O_2 (hidrogen peroksida), dan OH (hidroksil) melalui peningkatan kebocoran elektron untuk molekul oksigen (Arora *et al.*, 2002). Menurut Yordanov *et al.*, (2000) menyatakan bahwa produksi ROS yang berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif yang berpengaruh terhadap kerusakan tanaman dengan mengoksidasi pigmen fotosintesis, membrane lipid, protein dan asam nukleat. Pada sistem biologi dalam keadaan normal reduksi O_2 menjadi H_2O dalam rantai pernafasan dikatalisis oleh enzim sitokrom oksidase yang memerlukan empat buah elektron, namun 10% total konsumsi oksigen dalam mitokondria dan sistem transport

elektron mikrosomal, metabolisme asam arakhidonat dan reaksi reaksi dalam peroksisome menghasilkan ROS (Lautan, 1997).

Senyawa radikal bebas dapat mengganggu bagi integritas sel karena bereaksi dengan komponen-komponen sel baik komponen struktural (molekul penyusun sel) maupun komponen fungsional (enzim dan DNA) sehingga terjadi kerusakan pada sel (Papas, 1999). *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) secara langsung dapat merusak protein, asam amino dan asam nukleat serta peroksidasi membran lipid (Det *et al.*, 2000). Tanaman membentuk mekanisme perlindungan khusus yang melibatkan antioksidan enzimatik dan non enzimatik untuk melawan ROS. Antioksidan non enzimatik termasuk glutathione dan askorbat (Alscher, 1989), sedangkan antioksidan enzimatik termasuk superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), peroksidase (POX), askorbat peroksidase (APX) dan glutathione reduktase (GR) (Bowler *et al.*, 1992).

Berikut merupakan skema generasi ROS dan bentuk pertahanan tanaman berupa antioksidan enzimatik (SOD dan CAT):



Gambar 1. Skema pembentukan generasi ROS pada tanaman.

Sumber: Sharma *et al.*, 2012

Aktivasi oksigen (O_2) terjadi pada dua mekanisme yang berbeda. Pengurangan monovalen secara bertahap dapat memicu pembentukan superoksida anion ($O_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil ($\cdot OH$) sedangkan energi yang ditransfer ke oksigen (O_2) mengarah ke pembentukan singlet oksigen (1O_2). Superoksida anion ($O_2^{\cdot-}$) dapat dismutasi oleh enzim superoksida dismutase

(SOD) yang dapat mengubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida (H_2O_2) diubah menjadi air (H_2O) oleh katalase (CAT), guaiacol peroksidase (GPX), dan askorbat peroksidase (APX) (Sharma *et al.*, 2012).

2.5 Superoxide Dismutase (SOD) dan Katalase (CAT)

Sistem antioksidan sebagai mekanisme perlindungan terhadap serangan radikal bebas secara alami telah ada di dalam tanaman dan terdiri dari banyak komponen diantaranya superoksida dismutase (SOD) (Arivazhagan, 2000). Peningkatan pembentukan ROS dapat dikendalikan agar tetap berada dalam kondisi yang stabil dengan adanya sistem antioksidan yang dimiliki oleh tanaman baik bersifat non enzimatis maupun enzimatis untuk melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Enzim ini merupakan sekelompok metalloenzymes dan dianggap sebagai pertahanan pertama melawan ROS yang berperan dalam dismutasi O_2 (Gratao *et al.*, 2005). Pada sistem biologi, berbagai macam radikal bebas akan berperan dalam oksidasi lipid dan anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) yang dihasilkan oleh xanthine oksidase dan hidrogen peroksida diubah oleh superoksida dismutase sedangkan enzim katalase berperan penting dalam mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Widowati, 2005).

Katalase sebagai antioksidan endogen mempunyai peran yang sangat penting dalam mengontrol radikal bebas berupa konsentrasi H_2O_2 , dengan 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 (Det *et al.* 2003). Menurut Gratao *et al.* (2005) menyatakan bahwa katalase adalah enzim yang paling efisien sebagai enzim antioksidan yang mengkatalis H_2O_2 menjadi air dan O_2 , sehingga dapat menurunkan hidrogen peroksida atau superoksida yang menumpuk dan bersifat racun dalam pertumbuhan tanaman (Bowler *et al.*, 1992). Berdasarkan beberapa studi menunjukkan bahwa aktifitas enzim katalase di induksi oleh Fe. Rendahnya kandungan besi (Fe) dapat berdampak negatif pada aktivitas enzim katalase. Sebaliknya apabila sifat molekul besi tidak stabil maka berpotensi menghasilkan

berbagai bentuk radikal bebas yang dapat membahayakan kerusakan sel (Anonim, 2011).

2.6 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang, tujuan, dan pustaka, maka hipotesis yang diajukan yaitu adanya cekaman kekeringan menggunakan PEG pada bibit melinjo dapat berpengaruh nyata terhadap peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS), sehingga antioksidan pada bibit melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang bersifat enzimatis yakni berupa superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT) akan terstimulir dan mengalami peningkatan. Penggunaan umur bibit yang berbeda yakni 1 bulan, 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan bertujuan untuk mengetahui respon yang diduga berbeda dengan adanya penginduksian PEG pada bibit tersebut.

BAB 3. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dengan judul Induksi *polyethylene glycol* (PEG) terhadap karakter superoxide dismutase (SOD) dan katalase (CAT) pada melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dilaksanakan pada Bulan Juli 2014 sampai dengan April 2015, di *green house* Fakultas Pertanian dan *Center for Development of Advance Sciences and Technology* (CDAST), Universitas Jember.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tanaman melinjo dengan umur yang berbeda, media tanam pasir, tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1:1, PEG 6000, brilliant blue G-250, H₂O₂, Tris-base, HCl, NaOH, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, pyrogallol, metanol, aminoantipyrine, triton X-100, phenol dan peroksidase “Amano” 3 serta bahan pendukung lainnya.

3.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, timba, polibag, oven, timbangan, mikropipet, tabung reaksi, pH meter, sentrifuge TOMY MRX-150, vortex, spektrofotomer Hitachi U-2900, serta berbagai alat pendukung lainnya.

3.3 Rancangan Percobaan

Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor, 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%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yakni diawali dengan tahap 1: pembuatan media tanam berupa pasir, tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1:1, tahap 2: penanaman bibit melinjo, tahap 3: penginduksian PEG 6000. Tahap 4: analisis kandungan klorofil, pengukuran total protein terlarut, pengukuran penangkapan anion superoksida (O_2^-), pengukuran penangkapan dan kandungan hidrogen peroksida (H_2O_2) dan analisis aktivitas enzim antioksidan superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT) serta pengaruh pada pertumbuhan bibit melinjo (*Gnetum gnemon L.*)

3.4.1 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 x 20 cm sebanyak 1100 g dan melakukan penjemuran selama 1 hari dan mengukur kapasitas lapang pada media tanam.

3.4.2 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.

3.4.3 Analisis Kandungan Klorofil Total

Kandungan klorofil diukur dengan menggunakan metode Poorter *et al* (2011) yakni melarutkan 0,1 gram daun yang telah digerus dengan larutan acetoni 80% dan disentrifuse dengan kecepatan 4500 rpm, selanjutnya pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 663 (A_{663}), 646 (A_{646}), dan 710 (A_{710}) nm. Rumus kandungan klorofil yaitu :
Klorofil total (mg/L) = $7.18 (A_{663} - A_{710}) + 17.32 (A_{646} - A_{710})$.

3.4.4 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 µl dan ditambah dengan 45 µl aquadest serta 950 µl larutan Bradford dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

3.4.5 Pengukuran Penangkapan Superoxide Anion (O_2^-) Dan Hidrogen Peroksida (H_2O_2)

Penangkapan anion superoksida (O_2^-) diukur dengan cara *auto-oxidation of pyrogallol* (Tang *et al*, 2010) pada panjang gelombang 320 nm selama 240 detik. Singkatnya, bahan yang dihomogenkan antara lain 100 µl methanol, 1800 µl, 50 mM Tris-HCl pH 8,2 dan 100 µl ekstrak sampel. Selama proses pergantian pengujian sampel dalam spektrofotometer, ditambahkan dengan 100 µl 0.01 M

pyrogallol dan dihomogenkan selanjutnya *dimeasure* slope pyrogallol sehingga muncul grafik dan slope.

Perhitungan penangkapan hidrogen peroksida dilakukan menurut metode Ruch *et al* (1989) yakni dengan cara memasukkan 10 µl ekstrak sampel dicampur dengan 3,4 ml 0,1 M Buffer phosphate pH 7 dan 600 µl 40 mM H₂O₂ kemudian diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 230 nm.

3.4.6 Pengujian Aktivitas Enzim

3.4.6.1 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 µl 0,2 mM pirogalol (dilarutkan dalam 50 mM PPB pH 6,5) untuk memulai reaksi, dan penurunan absorbansi pyrogallol dipantau di 420 nm.

3.4.6.2 Katalase (CAT)

Pengujian aktivitas katalase dilakukan dengan mencampurkan 712,5 µl phenol buffer (1.36 g KH₂PO₄ yang dicampur dengan 3 ml larutan phenol dan 3 ml larutan Triton X-100), 31,25 µl (4 mg/ml) larutan aminoantipyrine, 156,25 µl 30% substrat H₂O₂, ketiga larutan tersebut dihomogenkan dan dijaga pada suhu 37°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 100 µl ekstrak sampel dan dicampur rata. Pada menit ke 2 dan ke 5 setelah penambahan ekstrak sampel *dimeasure*. Panjang gelombang yang digunakan adalah 500 nm.

3.5 Parameter pengamatan

Adapun parameter yang diamati antara lain :

1. Panjang akar (cm)
2. Tinggi tanaman (cm)
3. Berat basah total (g)

4. Rasio akar:tajuk tanaman (%)
5. Luas daun (cm²)
6. Total kandungan klorofil (mg/L)
7. Total protein terlarut (mg BSA/g sampel)
8. Penangkapan anion superoksida (O₂^{·-}) dan hidrogen peroksida (H₂O₂) serta kandungan hidrogen peroksida dengan satuan (%)
9. Aktivitas enzim Superoxide dismutase (SOD) (unit/mg protein)
10. Aktivitas enzim Katalase (CAT) (unit/mg protein)