

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING XIII-3

repository.ub.ac.id



22 FEB 2008

22 FEB 2008
0800492

Judul Penelitian:

Seleksi Plasma Nutfah Kedelai Toleran Kekeringan secara
In Vitro dan *Ex Vitro* serta Karakterisasi Mekanisme
Toleransinya terhadap Kekeringan

Peneliti:

Dr. Wahyu Widoretno, M.Si.
Ir. Retno Mastuti, M.AgSc. D.AgSc.
Dra. Serafinah Indriyani, M.Si.

Dibiayai oleh Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat,
Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penugasan Penelitian Desentralisasi
Nomor: 017/SP2H/PP/DP2M/III/2007
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional

UNIVERSITAS
BRAWIJAYA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Nopember 2007

1. Judul Penelitian

: Seleksi plasma nutfah kedelai toleran kekeringan secara seleksi *in vitro* dan *ex vitro* serta mekanisme toleransinya terhadap kekeringan

2. Ketua Peneliti:

- a. Nama : Dr. Wahyu Widoretno, M.Si.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 131 837 969
- d. Jabatan fungsional : Lektor
- e. Jabatan Struktural : Kepala Laboratorium Fisiologi dan Kultur Jaringan Tumbuhan, Jurusan Biologi, FMIPA, Unibraw.
- f. Bidang Keahlian : Fisiologi Tumbuhan/Kultur Jaringan Tumbuhan
- g. Fakultas/Jurusan : Biologi, Fakultas MIPA
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya Malang
- i. Tim Peneliti

No.	Nama dan gelar Akademik	Bidang keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Ir. Retno Mastuti, MAgSc., DAgSc.	Kultur Jaringan Tumbuhan	FMIPA-Biologi	Universitas Brawijaya
2	Dra. Serafinah Indriyani, M.Si.	Biologi Perkembangan Tumbuhan	FMIPA-Biologi	Universitas Brawijaya

3. Pendanaan dan Jangka waktu penelitian

- a. Jangka Waktu Penelitian : Tiga (3) tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 125.000.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun 2006 : Rp. 32.000.000,-

Malang, 31 Oktober 2007

Mengetahui,
Dekan FMIPA, Universitas Brawijaya

Ketua Peneliti,

Dr. Adam Wiryawan, MS.
NIP 131 413 446

Dr. Wahyu Widoretno, M.Si.
NIP 131 837 969

Menyetujui,
An: Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Brawijaya
Sekretaris,

Prof. Dr. Ir. Siti Chuzaemi, MS.
NIP. 130 809 321

repository.ub.ac.id



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

RINGKASAN DAN SUMMARY

Ringkasan

Stres kekeringan merupakan salah satu faktor lingkungan yang membatasi produksi kedelai. Tanaman mengembangkan mekanisme morfologi, fisiologi dan biokimia yang berbeda untuk mengatasi stress kekeringan. Kemampuan bertahan hidup di dalam kondisi stress tergantung pada kemampuan tanaman untuk menerima stimulus, menghasilkan dan meneruskan sinyal dan menginisiasi berbagai macam perubahan fisiologis dan biokimia. Akumulasi prolin dan gula pada tanaman tinggi merupakan respon fisiologis terhadap stress kekeringan. Prolin dan gula dianggap memegang peran penting dalam mekanisme pertahanan sel yang mengalami stress kekeringan.

Stres kekeringan tidak hanya menginduksi akumulasi prolin dan gula, tetapi juga dapat menyebabkan peningkatan produksi reactive oxygen species (ROS) yang dapat menyebabkan kerusakan pada lipid membran, protein dan asam nukleat yang dapat menyebabkan kematian sel. Tanaman mengembangkan mekanisme proteksi enzimatik yang dapat memulung (scavenge) ROS dan mencegah pengaruh merusak dari radikal bebas. Enzim antioksidan seperti superoksid dismutase (SOD), katalase (CAT) dan peroksidase (POX) merupakan enzim yang berperan penting dalam memulung ROS.

Berdasarkan permasalahan di atas, tujuan dari penelitian hibah bersaing pada tahun ke tiga ini adalah: (1) mengamati pengaruh stress kekeringan pada fase pertumbuhan vegetatif kedelai pada kandungan prolin dan gula total terlarut serta aktivitas enzim antioksidan (SOD, CAT dan POX), (2) mempelajari perubahan aktivitas enzim oksidatif pada kecambah kedelai yang mengalami stress kekeringan, (3) mengamati apakah aktivitas enzim antioksidan tertentu merupakan indikator untuk toleransi kekeringan dari tanaman kedelai. Studi ini juga dapat memberikan informasi yang bermanfaat terhadap pemahaman yang lebih baik tentang mekanisme toleransi kekeringan. Pemahaman tentang mekanisme toleransi terhadap cekaman kekeringan akan dapat membantu program pemuliaan kedelai untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan.

Karakterisasi mekanisme untuk toleransi terhadap stres kekeringan dilakukan dengan analisis karakter fisiologis (prolin dan gula total terlarut) dan biokimia (aktivitas SOD, CAT dan POX). Analisis fisiologis (prolin dan gula total terlarut) dan

biokimia (aktifitas SOD, katalase dan peroksidase) untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan akan dilakukan pada populasi tanaman kedelai yang ditanam dalam kondisi stres PEG dan non-stres PEG pada fase perkecambahan atau fase vegetatif. Analisis dilakukan pada genotipe kelompok toleran dan peka kekeringan. Analisis dilakukan menggunakan berbagai metode standar untuk melakukan analisis terhadap berbagai karakter fisiologis dan biokimia tanaman.

Penurunan potensial air pada fase pertumbuhan vegetatif kedelai mampu meningkatkan akumulasi prolin dan gula total terlarut. Peningkatan akumulasi prolin dan gula total terlarut dalam kondisi stres kekeringan bervariasi diantara genotip kedelai yang diuji. Akumulasi prolin dapat digunakan sebagai indikator toleransi kekeringan, sedangkan peningkatan akumulasi gula total terlarut dalam kondisi stres kekeringan tidak berkorelasi dengan tingkat toleransi varietas kedelai terhadap stres kekeringan. Varietas toleran mengalami peningkatan akumulasi prolin lebih tinggi dengan kecenderungan memiliki pola yang teratur, dibandingkan dengan varietas peka.

Penurunan potensial air selama fase pertumbuhan vegetatif kedelai juga menyebabkan perubahan aktivitas enzim SOD dan POX pada jaringan daun dan akar. Perubahan aktifitas SOD dan POX di bawah kondisi stres kekeringan sangat dipengaruhi oleh varietas kedelai yang diuji dan besarnya penurunan potensial air. Perubahan aktivitas SOD dan POX pada jaringan daun di bawah kondisi stres kekeringan berkorelasi dengan tingkat toleransi varietas terhadap stres kekeringan. Penurunan potensial air menyebabkan peningkatan aktifitas SOD pada jaringan daun dari varietas toleran Dieng dan Tidar tetapi menurunkan aktifitas SOD pada varietas peka. Sebaliknya penurunan potensial air menurunkan aktifitas POX pada jaringan daun dari varietas toleran dan meningkatkan aktifitas POX pada varietas peka.

Perubahan aktifitas SOD, CAT dan POX di bawah kondisi stres kekeringan pada fase perkecambahan juga dipengaruhi oleh varietas kedelai yang diuji dan besarnya penurunan potensial air. Pada potensial $-0,67$ Mps, penurunan aktivitas SOD pada jaringan daun dan aktivitas peroksidase pada jaringan akar dari varietas toleran lebih rendah dibandingkan dengan varietas peka. Sedangkan aktivitas CAT pada jaringan hipokotil dan akar antara varietas toleran dan peka tidak menunjukkan pola yang jelas.

Summary

Drought stress is one of the most important environmental factors limiting soybean production. Plants have developed different morphological, physiological and biochemical mechanisms to withstand drought stress. Survival under this stressful condition depends on the plant's ability to perceive the stimulus, generate and transmit the signals, and initiate various physiological and chemical changes. Proline and sugar accumulation in higher plants is a characteristic physiological response to drought stress. Proline is considered to play an important role in defense mechanisms of stressed cells.

Drought stress not only induces accumulation of ABA, proline and sugar, but it also causes an enhancement in the generation of reactive oxygen species (ROS) which may cause damage to membrane lipids, proteins and nucleic acids, leading to the death of the cells. Plants have evolved enzymatic protection mechanisms that efficiently scavenge ROS and prevent damaging effects of free radicals. Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX) are involved in the scavenging of ROS. The ability to adjust their antioxidant systems to changing ROS concentrations may be vital to all species under stress conditions.

Based on the reasons, the objectives in the third years of *Penelitian Hibah Bersaing* were (1) to observe the effects of drought stress at vegetative stage of soybean on proline and soluble sugar total contents and antioxidant enzyme activities, (2) to study the change in antioxidative enzyme activities in drought-stressed seedling of soybean (3) to investigate whether the activity of certain antioxidant enzymes was indicative of the drought tolerance of soybean plants. The study also may provide useful information for better understanding the mechanism of drought tolerance. Understanding of mechanism for drought stress tolerance will support breeding program for drought stress tolerance in soybean.

Characterization of the mechanism for drought stress tolerance was conducted by analysis of physiological (proline and soluble total sugar) and biochemical characters (activities of SOD, CAT and POX) of plant. Analysis of proline, soluble total sugar, and activities of SOD, CAT and POX were conducted on stressed and non-stressed plants at germination or vegetative stages. The analysis will be done on tolerant and sensitive varieties. The proline and soluble total sugar and the activities of antioxidant enzymes were measured by standard methods to analyze for physiological and biochemical characters.

Drought stress or decreasing water potential at vegetative stage of soybean increased proline and soluble total sugar. Increasing the content of proline and soluble total sugar were varying among tested soybean genotypes. Accumulation of proline could be used as an indicator for drought stress tolerance of soybean. The accumulation of proline on tolerant genotypes was higher than sensitive ones and had regular pattern. While the accumulation of soluble total sugar of soybean under drought stress condition could not be used as an indicator for drought stress tolerance of soybean.

Decreasing of water potential during soybean vegetative phase caused change of SOD and POX activities on leave and root tissues. The change of SOD and POX under drought stress condition depends on tested varieties and level of water potential decreasing. There were correlations between the change of SOD and POX activities on leave tissues and variety tolerance level to drought stress. Decreasing of water potential could raise SOD activity on Dieng and Tidar tolerant varieties; however it reduced that enzyme activity on sensitive variety. In other hand, POX activity on leave tissues of tolerant variety decreased as lower potential water, but increased on sensitive variety.

The change of SOD, CAT and POX under drought stress condition at germination stage was influenced by kind of tested varieties and level of water potential. Water potential at -0,67 Mpa reduced SOD activity on leave tissues and POX activity on root tissues from tolerant varieties less than sensitive varieties. However, there were no CAT activity pattern significantly on hypocotyls and root tissues between tolerant and sensitive varieties.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
BAB IV. METODE PENELITIAN	11
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	42
B. DRAF ARTIKEL ILMIAH	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
4.1.	Konsep dan pendekatan penelitian dalam PHB XIII	15
4.2.	Karakter morfologis, anatomis, fisiologis dan biokimia yang dievaluasi dalam Kegiatan Penelitian Hibah Bersaing XIII untuk mengetahui mekanisme toleransi kekeringan pada kedelai	16
5.1.1	Pengaruh stres kekeringan pada kandungan prolin dan gula total terlarut pada daun kedelai	18
5.1.2	Pengaruh stres kekeringan pada kandungan prolin daun dari kedelai genotipe toleran, medium dan peka	19
5.1.3	Peningkatan kandungan prolin genotipe toleran, medium dan peka pada potensial air -0,41 MPa dan -0,67 MPa	19
5.1.4.	Pengaruh stres kekeringan pada kandungan gula total terlarut daun dari kedelai genotipe toleran, medium dan peka	20
5.1.5.	Peningkatan kandungan gula total terlarut genotipe toleran, medium dan peka pada potensial air -0,41 MPa dan -0,67 Mpa	21
5.2.1.	Pengaruh penurunan potensial air selama pertumbuhan vegetatif Terhadap aktivitas enzim SOD dan POX pada jaringan daun dan akar dari empat varietas kedelai	22
5.3.1.	Pengaruh penurunan potensial air dalam media tanam terhadap perkecambahan beberapa varietas kedelai	25
5.2.2.	Pengaruh penurunan potensial air terhadap aktifitas enzim SOD, CAT dan POX pada jaringan hipokotil dan kecambah pada empat varietas kedelai.	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Rata-rata persentase perkecambahan dan panjang hipokotil kecambah Di bawah kondisi stres kekeringan	42
2. Biodata Peneliti	43



BAB I

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* [L.] Merr) merupakan salah satu komoditas tanaman pangan yang sangat penting di Indonesia. Kedelai merupakan sumber protein dan lemak nabati yang relatif murah dan merupakan bahan baku industri pangan, yang posisinya semakin penting sejalan dengan semakin berkembangnya industri makanan.

Produksi kedelai di Indonesia relatif rendah dibandingkan dengan berbagai negara penghasil komoditas ini. Hasil kedelai per hektar di Indonesia tercatat sekitar 1,08 ton/ha (Bhatnagar & Tiwari 1996). Pada tahun 2001 produksi total kedelai di Indonesia sekitar 817.017 ton dari luas area 673.848 ha (BPS 2001). Pada tahun 1999 produksi nasional 1.382.848 ton dan masih mengimpor sebanyak 839.965 ton. Diproyeksikan oleh Bank Dunia kebutuhan kedelai pada tahun 2001 akan mencapai 4,9 juta ton/tahun (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian 1997). Jika kenaikan produksi kedelai nasional tidak seimbang dengan peningkatan kebutuhan maka kita harus mengimpor dalam jumlah yang sangat besar.

Usaha untuk meningkatkan produksi kedelai seringkali terhambat karena keterbatasan lahan yang cocok untuk budidaya kedelai. Kedelai seringkali ditanam setelah tanaman pangan utama di akhir musim penghujan sehingga ketersediaan air seringkali menjadi kendala. Cekaman kekeringan merupakan salah satu faktor pembatas dalam produksi kedelai karena dapat berpengaruh negatif terhadap berbagai tahapan pertumbuhan kedelai dan pengaruhnya dapat dilihat secara anatomis, morfologis, fisiologis dan biokimia (Masyhudi & Patterson 1991, Shimada *et al.* 1992, Vieira *et al.* 1992, Widoretno *et al.*, 2003). Selain itu cekaman kekeringan pada setiap tahapan perkembangan tanaman dapat secara langsung maupun tidak langsung berpengaruh negatif terhadap hasil biji kedelai (Budianto dkk. 1984, Pookpadi *et al.* 1990, Sloane *et al.* 1990, Franca-Neto *et al.* 1993, Sudarsono & Widoretno 2003).

Dengan demikian pengembangan komoditas kedelai sangat perlu untuk dilakukan. Sehubungan dengan hal ini, berbagai penelitian yang dapat mendukung kegiatan pengembangan kedelai harus dilakukan agar permasalahan yang mungkin akan dihadapi dapat diantisipasi dan dicarikan pemecahannya.

Walaupun cekaman kekeringan merupakan salah satu faktor pembatas produksi kedelai, tetapi varietas kedelai yang toleran kekeringan tidak banyak yang telah dilepaskan (Carter & Rufty 1992, Adisarwanto & Wudianto 1999). Diantara sekitar

1000 nomor koleksi plasma nutfah kedelai di Indonesia, ada 55 varietas yang telah dibudidayakan petani (Suhartina 2003). Namun demikian dari jumlah tersebut belum ada informasi mengenai tingkat toleransinya terhadap cekaman kekeringan. Oleh karena itu pengembangan galur kedelai yang toleran terhadap stress kekeringan melalui program pemuliaan tanaman menjadi sangat penting untuk dilakukan.

Didapatkannya varietas yang toleran kekeringan akan dapat membantu pengembangan kedelai di lahan yang mempunyai masalah ketersediaan air pada periode tanam tertentu. Varietas kedelai yang toleran kekeringan diperoleh melalui hibridisasi antara genotipe yang membawa karakter toleran dan melalui berbagai tahapan seleksi. Seleksi untuk sifat toleran cekaman kekeringan biasanya dilakukan dengan perlakuan kekeringan di lapang (Sloane *et al.* 1990, Carter & Rufty 1992, Rosario *et al.* 1993, Thomas *et al.* 1996, Sneller & Dombek 1997). Hal tersebut diketahui mempunyai kelemahan, antara lain: sulitnya menjaga keseragaman tekanan seleksi yang diberikan, membutuhkan lahan yang luas, waktu yang relatif lama untuk menyelesaikan seleksi. Penanganan seleksi di lapang juga sulit karena kedua hal tersebut di atas. Beberapa kendala dalam pengujian/evaluasi toleransi tanaman kedelai terhadap cekaman kekeringan tersebut di atas merupakan penyebab belum adanya varietas kedelai yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Selain itu juga belum ada informasi mengenai tingkat toleransi terhadap cekaman kekeringan dari 55 varietas kedelai yang telah dilepaskan/dibudidayakan oleh petani. Adanya galur yang toleran dan informasi mengenai tingkat toleransi kekeringan dari 55 varietas kedelai yang telah dibudidayakan akan sangat membantu petani dalam menentukan varietas yang akan digunakan sesuai dengan kondisi lingkungan maupun waktu tanam.

Penelitian Hibah Bersaing ini berusaha untuk mengatasi salah satu masalah yang diantisipasi dihadapi saat ini dan akan dihadapi di masa yang akan datang dalam budidaya kedelai. Hasil yang didapat dari Penelitian Hibah Bersaing ini diharapkan akan menjadi salah satu alternatif cara memecahkan masalah rendahnya produktivitas kedelai di Indonesia. Penelitian Hibah Bersaing ini merupakan salah satu aspek dari penelitian payung yang dikerjakan di Universitas Brawijaya dengan tujuan untuk mengembangkan kedelai di Indonesia.

Peneliti di Universitas Brawijaya telah mengembangkan metode induksi embrio somatik dan seleksi *in vitro* untuk toleransi terhadap stress kekeringan pada kedelai dengan menggunakan (Widoretno *et al.* 2003c). Dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa PEG dapat berfungsi sebagai *selective agent* karena mampu menghambat

perkembangan embrio somatik (ES) kedelai yang dikulturkan dalam medium induksi ES dengan penambahan PEG. Kemampuan membentuk embrio somatik pada media yang mengandung PEG berkorelasi dengan tingkat toleransi kedelai terhadap cekaman kekeringan.

Peneliti di Universitas Brawijaya juga telah mengembangkan metode penapisan respon tanaman terhadap stress kekeringan dengan penambahan larutan PEG. Dalam penelitian tersebut telah dibuktikan bahwa PEG dapat digunakan untuk menapis respon genotipe kedelai terhadap stress kekeringan pada fase perkecambahan (Widoretno *et al.* 2002b) dan fase vegetatif (Widoretno *et al.* 2002a). Beberapa sifat positif dari metode penapisan yang telah dikembangkan ini antara lain mampu mengidentifikasi individu tanaman kedelai yang toleran stres kekeringan dengan cepat, memberikan lingkungan seleksi yang homogen dan mampu menyeleksi populasi tanaman kedelai dalam jumlah banyak. Metode seleksi *in vitro* dan *ex vitro* untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan ini merupakan pendukung utama untuk melakukan skrining/penapisan respon terhadap kekeringan pada plasma nutfah kedelai yang ada di Indonesia dan identifikasi galur kedelai yang toleran kekeringan.

Seleksi *in vitro* dari sel yang memperlihatkan toleransi yang meningkat terhadap stress kekeringan dianggap sebagai alternatif bioteknologi terhadap pemuliaan tanaman konvensional dan sebagai model untuk mempelajari proses-proses fisiologis dan biokimia yang terlibat dalam mekanisme toleransi. Pemahaman yang baik dari respon morfologis, anatomis, fisiologis dan biokimia terhadap cekaman kekeringan dapat membantu program pemuliaan untuk meningkatkan toleransi terhadap kekeringan dari tanaman kedelai.

Tanaman tingkat tinggi memperlihatkan adaptasi yang luas secara morfologis, anatomis, fisiologis, biokimia dan molekuler sebagai respon terhadap cekaman kekeringan. Respon tanaman terhadap cekaman kekeringan antara lain stomata menutup, daun menggulung, senescensi daun, *osmotic adjustment*, sintesis dan akumulasi asam absisat (ABA) di akar, sintesis dan akumulasi gula dan prolin, (Quarrie 1989, Schurr *et al.* 1992, Zhang & Kirkham 1994, Popova *et al.* 1996, Pelah *et al.* 1997, Robert 1998, Quintero *et al.* 1998). Cekaman kekeringan juga mempengaruhi aktivitas beberapa enzim, antara lain superoxide dismutase (SOD), peroxidase, dan Catalase (Zhang & Kirkham 1994, Zapata *et al.* 1995, Olsson *et al.* 1995, Piqueras *et al.* 1996.).

Penelitian Hibah Bersaing ini bermaksud menggunakan metode seleksi *in vitro* dan *ex vitro* untuk melakukan skrining/seleksi untuk toleransi terhadap kekeringan pada plasma nutfah kedelai yang ada di Indonesia. Dari hasil seleksi ini diharapkan akan teridentifikasi beberapa galur kedelai yang toleran kekeringan. Selain itu, dalam Penelitian Hibah Bersaing ini, seleksi *in vitro* juga akan digunakan untuk mempelajari mekanisme yang mendasari toleransi terhadap cekaman

Target jangka panjang dari penelitian yang dilakukan adalah untuk mendapatkan galur kedelai yang toleran terhadap kekeringan dan mengetahui mekanisme toleransinya terhadap cekaman kekeringan.

Dalam tiga tahun **Penelitian Hibah Bersaing** yang diajukan, target dari kegiatan penelitian adalah sebagai berikut: (1). Mendapatkan informasi mengenai tingkat toleransi kekeringan plasma nutfah kedelai yang ada di Indonesia /Pengelompokan plasma nutfah kedelai dalam kelompok toleran, medium dan peka kekeringan, (2). Mendapatkan galur kedelai yang toleran terhadap cekaman kekeringan, (3). Mengetahui mekanisme fisiologis, biokimia dan molekular dari toleransi terhadap cekaman kekeringan dari kedelai, (4). Mendapatkan sifat/karakter morfologis dan anatomis untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan dari kedelai

Dalam tiga tahun Penelitian Hibah Bersaing yang diajukan, **tujuan khusus dari kegiatan penelitian tahun ke III** ini adalah sebagai berikut: (1). Mengetahui pengaruh stress kekeringan pada fase pertumbuhan vegetatif kedelai pada kandungan prolin dan gula total terlarut serta aktivitas anzim antioksidan (SOD, CAT dan POX). (2). Mengevaluasi perubahan aktivitas enzim oksidatif (SOD, CAT dan POX) pada kecambah kedelai yang mengalami stress kekeringan, dan (3). Mengamati apakah aktivitas enzim antioksidan tertentu merupakan indikator untuk toleransi kekeringan dari tanaman kedelai.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pengaruh cekaman kekeringan pada kedelai

Adanya cekaman kekeringan sangat tidak diinginkan dalam usahatani kedelai karena membatasi pertumbuhan dan produktivitas tanaman (Yoshiba *et al.* 1997), menurunkan kecepatan fiksasi dan akumulasi N (Weisz *et al.* 1985, Masyhudi & Patterson 1991), transpirasi air dan transportasi fotosintat (Pookpadi *et al.* 1990, Vieira *et al.* 1992), ukuran biji, ukuran polong dan bobot kering polong (Pookpadi *et al.* 1990, Widoretno *et al.* 2004), luas area dan kandungan klorofil daun (Shimada *et al.* 1992) dan kualitas biji (Franca-Neto *et al.* 1993).

Cekaman kekeringan mempengaruhi setiap aspek pertumbuhan tanaman kedelai yang meliputi anatomis, morfologis, fisiologis, biokimia dan molekular tanaman (Raper & Kramer 1987, Widoretno *et al.* 2003). Adanya cekaman kekeringan dalam setiap periode pertumbuhan dan perkembangan tanaman dapat menurunkan hasil kedelai meskipun besarnya penurunan tergantung pada fase pertumbuhannya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fase pertumbuhan yang paling peka terhadap cekaman kekeringan adalah pada fase pembungaan dan saat pengisian polong (Pasaribu & Sunarlim 1988, Sudarsono & Widoretno 2003).

Fase perkecambahan biji kedelai diketahui memerlukan ketersediaan air dalam jumlah yang cukup, yang dapat mencapai antara 500 g/kg bobot kering benih. Berkurangnya kandungan air tanah menjadi setengah kapasitas lapang akan menurunkan perkecambahan kedelai. Benih kedelai biasanya hanya akan berkecambah pada potensial air tanah sebesar $-0,6$ Mpa (Raper & Kramer 1987).

Pada fase pertumbuhan vegetatif, ketersediaan air berpengaruh pada beberapa aspek fisiologi serta morfologi, antara lain: menurunnya kecepatan fotosintesis dan luas daun. Jika tanaman kedelai terkena cekaman kekeringan akibat menurunnya ketersediaan air tanah sehingga menyebabkan terjadinya penurunan potensial air daun, maka pembentukan klorofil akan terganggu (Alberte *et al.* 1977) dan struktur kloroplas akan mengalami disintegrasi (van Doren & Reicosky 1987).

Tanaman kedelai pada fase perkembangan reproduktif sangat peka terhadap cekaman kekeringan. Kondisi cekaman kekeringan dapat menyebabkan gugurnya bunga, polong dan biji yang telah terbentuk. Hal ini berhubungan dengan penurunan kecepatan fotosintesis akibat keterbatasan ketersediaan air (Sloane *et al.* 1990). Hasil penelitian juga

telah membuktikan cekaman kekeringan 75% kapasitas lapang yang terjadi selama fase perkembangan reproduktif diketahui menurunkan produksi biji kedelai sampai 50% (Budianto dkk. 1984). Jika cekaman kekeringan dapat dihindarkan pada fase pengisian biji maka fotosintesis dan pertumbuhan tanaman dapat menjadi normal kembali dan hasil biji kedelai dapat diharapkan sesuai dengan potensi genetiknya.

Adanya pengaruh cekaman kekeringan yang sedemikian besar terhadap pertumbuhan dan perkembangan kedelai tersebut dapat menjelaskan mengapa produktivitas kedelai di Indonesia relatif kecil. Kebanyakan usaha tani kedelai di Indonesia dilakukan di lahan kering dengan mengandalkan air hujan (tadah hujan). Dengan demikian kedelai di lapangan sering menghadapi cekaman kekeringan dalam periode pertumbuhan dan perkembangannya, yang selanjutnya menjadi salah satu penyebab utama rendahnya produktivitas hasil kedelai.

Meskipun cekaman kekeringan tidak menyebabkan terjadinya kematian tanaman kedelai di lapang tetapi polong bernas yang dihasilkan oleh pertanaman yang mengalami cekaman kekeringan akan menurun. Penurunan jumlah polong bernas tersebut terjadi karena adanya kegagalan reproduktif yang disebabkan oleh terjadinya penurunan luas daun, jumlah daun dan bunga.

Permasalahan yang telah disebutkan di atas terjadi pada kultivar kedelai yang peka terhadap cekaman kekeringan. Respon galur kedelai yang toleran terhadap cekaman kekeringan akan berbeda. Sampai dengan tingkatan yang masih dapat ditolerir oleh galur tanamannya, cekaman kekeringan tidak akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman kedelai yang toleran cekaman kekeringan.

2.2. Respon tanaman terhadap cekaman kekeringan

Kandungan air tanaman untuk mempertahankan turgor dijaga oleh keseimbangan laju transpirasi dan penyerapan air oleh akar. Pada kondisi kering (kondisi dimana air tanah yang tersedia menurun) akan terjadi defisit kandungan air di jaringan tanaman yang selanjutnya menjadi faktor pemicu respon fisiologis dan biokimia tanaman dalam sel tanaman untuk mengatasi cekaman kekeringan (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 1994). Respon tanaman terhadap cekaman kekeringan dapat teramati pada level perkembangan (perubahan waktu pembungaan, pembentukan polong), morfologis (layu, daun menggulung dan celah stomata yang menurun), fisiologis (penurunan transpirasi dan potensial air rendah), dan biokimia (biosintesis ABA dan akumulasi solut) (Close 1996,

Pelah *et al.* 1997, Whitsitt *et al.* 1997, Widoretno *et al.* 2002a, Sudarsono & Widoretno, 2003).

Toleransi terhadap cekaman kekeringan dapat terjadi jika tanaman dapat survive terhadap cekaman yang terjadi dan adanya toleransi atau mekanisme yang memungkinkan menghindari dari situasi cekaman tersebut. Tanaman mempunyai toleransi yang berbeda terhadap cekaman kekeringan karena perbedaan dalam mekanisme morfologis, fisiologis, biokimia dan molekuler (Perez-Molphe-Balch *et al.* 1996, Sudarsono & Widoretno, 2003). Toleransi cekaman kekeringan melibatkan akumulasi senyawa yang dapat melindungi sel dari kerusakan yang terjadi pada saat potensial air rendah (Jensen *et al.* 1996). ABA dan prolin merupakan senyawa yang memegang peranan penting untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan (Kim & Janick 1991, Pruvod *et al.* 1996, Nambara *et al.* 1998, Hanson *et al.* 1979, Widoretno *et al.* 2002a).

Peningkatan sintesis ABA di akar, antara lain ditujukan untuk meningkatkan laju penyerapan air oleh akar untuk mengimbangi laju transpirasi. Dalam hal ini ABA berperan sebagai pengatur signal transport air secara radial (Quintero *et al.* 1998, Roberts 1998). Penyerapan air di akar ditentukan oleh besarnya gradien hidrostatik atau gradien osmotik (Quintero *et al.* 1998). Agar air tetap dapat mengalir ke arah jaringan akar maka potensial osmotik dari akar harus lebih negatif dari tanah.

Dalam kondisi cekaman kekeringan, ABA juga dapat ditranslokasikan melalui xilem ke bagian tanaman yang lain seperti tunas dan daun. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya peningkatan konsentrasi ABA pada cairan xilem jika tanah mengering (Schurr & Gollan 1990, Zhang *et al.* 1990). Di bagian tajuk tanaman, ABA akan mempengaruhi penutupan stomata. Dalam hal ini, ABA membatasi masuknya ion K^+ ke dalam sel penjaga (stomata) dan menyebabkan pembukaan channel ion K^+ sehingga memungkinkan pengeluaran ion K^+ dari sel stomata. Akibatnya, sel stomata menjadi kehilangan turgor dan stomata akan menutup (Quintero *et al.* 1998). Dari hal tersebut, ABA berperan sebagai signal dari akar bagi pucuk tanaman ketika mengalami cekaman kekeringan (Schurr *et al.* 1992). Kemampuan untuk mengatur turgor pucuk juga merupakan suatu karakteristik tanaman yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

Akumulasi prolin dalam respon terhadap cekaman kekeringan telah dilaporkan pada beberapa tanaman secara *in vitro* dan *in vivo* (Hanson *et al.* 1979, Handa *et al.* 1986, Sarkar 1993, Madan *et al.* 1995, Girouse *et al.* 1996, Widoretno *et al.* 2002a, Sudarsono & Widoretno 2003). Jumlah prolin yang meningkat dianggap merupakan indikasi toleransi terhadap cekaman kekeringan karena prolin berfungsi sebagai

senyawa penyimpan N dan osmoregulator dan/atau sebagai protektor enzim tertentu (Kim & Janick 1991, Madan *et al.* 1995, Prasad & Potluri 1996). Sebagai akibatnya sel, jaringan atau tanaman yang overproduksi prolin dianggap mempunyai sifat toleransi terhadap cekaman kekeringan yang lebih baik. Selain sebagai osmoregulator, prolin juga berperan penting dalam menjaga pertumbuhan akar pada potensial osmotik air rendah (Sharp 1990, Ober & Sharp 1994).

Akumulasi prolin pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan disebabkan oleh aktivasi biosintesis prolin dan inaktivasi degradasi prolin (Madan *et al.* 1995, Nambara *et al.* 1998). Hasil penelitian dari hubungan antara ekspresi gen-gen untuk enzim yang terlibat dalam biosintesis dan metabolisme prolin dan akumulasi prolin dalam kondisi cekaman kekeringan menunjukkan bahwa level prolin pada tanaman diatur pada level transkripsi (Yoshida *et al.* 1997).

Pada tanaman, prolin disintesis dari glutamin atau dari ornitin. Lintasan dari glutamin merupakan rute primer untuk sintesis di bawah kondisi cekaman kekeringan (Madan *et al.* 1995, Yoshida *et al.* 1997).

Stres kekeringan juga diketahui dapat bertindak sebagai katalis dalam menghasilkan reaksi radikal bebas, pada beberapa tanaman yang menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) atau senyawa oksigen reaktif seperti *superoxide radical* (O_2^-), *hydroxyl radical* (OH), *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *alkoxyl radical* (RO). ROS menyebabkan kerusakan-kerusakan pada molekul lipid, protein maupun DNA. Radikal superoksid bersifat toksik dan biasanya secara cepat akan didismutase oleh superokside dismutase (SOD) menjadi H_2O_2 . H_2O_2 dapat berbahaya bagi tanaman karena pengaruh oksidatif dan destruktifnya pada metabolisme tanaman. Di dalam organisme, H_2O_2 merupakan produk yang lebih stabil dan dapat didetoksifikasi oleh katalase dan peroksidase. Aktifitas SOD yang meningkat diketahui untuk mengatasi stres oksidatif. Jika kecepatan produksi radikal superoksid di bawah kondisi stres melebihi aktifitas SOD maka akan menghasilkan kerusakan oksidatif.

Di bawah kondisi normal, katalase pada beberapa sel mempunyai peran penting dalam meningkatkan resistensi terhadap stres oksidatif. Halliwell *et al.* (1990) melaporkan bahwa kandungan radikal bebas seperti superoksid dan peroksida dalam jaringan akan meningkat pada tanaman bunga matahari di bawah kondisi stres. Radikal-radikal ini menyebabkan kerusakan lipid pada bunga matahari. Aktifitas enzim-enzim dalam sistem antioksidan pada tanaman di bawah kondisi stres biasanya dianggap sebagai indikator dari toleransi genotip terhadap kondisi stres.

Pengaruh stres kekeringan terhadap perubahan enzim antioksidan nampaknya dikoordinasi oleh peningkatan sejumlah hormon. ABA dapat menyebabkan peningkatan ROS, menginduksi ekspresi gen antioksidan yang mengkode SOD dan katalase sehingga meningkatkan aktifitas enzim antioksidan seperti SOD, katalase, askorbat peroksidase dan glutathione reduktase. ABA nampak memerantarai proses-proses fisiologis dalam respon terhadap stres osmotik. Level ABA endogen meningkat pada jaringan yang terpapar pada stres osmotik.

Hasil penelitian Habibi *et al* menunjukkan bahwa tidak ada korelasi yang signifikan antara aktifitas enzim antioksidan dan stabilitas biji yang dihasilkan dan perkecambahan biji di bawah kondisi kekeringan diantara beberapa varietas yang diuji. Dengan demikian seleksi untuk resistensi, dengan menggunakan parameter enzim antioksidan tidak dapat digunakan.

Perlakuan ABA atau kekeringan juga dapat meningkatkan aktifitas SOD pada kultur sel tembakau, daun Arabidopsis, daun jagung dan bunga matahari. Aktifitas katalase dan glutathion reduktase pada daun muda *Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Alisa Craig (AC) dan *notabilis* meningkat sebagai respon terhadap kekeringan, sedangkan perlakuan ABA dapat meningkatkan aktifitas catalase dan glutathion reduktase pada daun *notabilis*.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian:

Dalam tiga tahun Penelitian Hibah Bersaing yang diajukan, **tujuan khusus dari kegiatan penelitian tahun ke III** ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh stress kekeringan pada fase pertumbuhan vegetatif kedelai pada kandungan prolin dan gula total terlarut serta aktivitas anzim antioksidan (SOD, CAT dan POX).
2. Mengevaluasi perubahan aktivitas enzim oksidatif (SOD, CAT dan POX) pada kecambah kedelai yang mengalami stress kekeringan,
3. Mengamati apakah aktivitas enzim antioksidan tertentu merupakan indikator untuk toleransi kekeringan dari tanaman kedelai.

3.2. Manfaat Penelitian:

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang bermanfaat terhadap pemahaman yang lebih baik tentang mekanisme toleransi kekeringan pada tanaman kedelai. Pemahaman tentang mekanisme toleransi terhadap cekaman kekeringan akan dapat membantu program pemuliaan kedelai untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Tanaman

Dalam penelitian ini digunakan 8 genotipe kedelai yang dikembangkan di Indonesia, yaitu varietas toleran kekeringan Dieng, Tidar dan galur MLG2805, varietas medium toleran Galunggung dan varietas peka Tambora, Burangrang, MSC8606, Galunggung. Benih diperoleh dari koleksi balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, Malang. Masing-masing genotipe tersebut ditanam dalam pot plastik yang berisi media tanam campuran tanah:pasir:pupuk kandang (2:1:1) dan dipelihara di rumah kaca sampai menghasilkan polong dan biji. Biji digunakan sebagai benih untuk uji kekeringan pada fase perkecambahan dan fase pertumbuhan vegetatif.

4.2. Metode

Beberapa tahapan kegiatan penelitian yang akan dilakukan pada tahun ke III penelitian meliputi:

1. Karakterisasi fisiologis (prolin dan gula total terlarut) untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan pada tanaman kedelai yang mengalami stres kekeringan pada fase vegetatif.
2. Karakterisasi perubahan aktivitas enzim antioksidan (SOD, CAT dan POX) sebagai respon terhadap stres kekeringan:
 - a. Respon kecambah kedelai dalam kondisi stres kekeringan
 - b. Respon tanaman kedelai dalam kondisi stres kekeringan pada fase vegetatif

Prosedur Percobaan

Analisis fisiologis dan biokimia untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan merupakan bagian yang menjawab mekanisme toleransi kekeringan pada kedelai. Dengan mengamati karakter fisiologis dan biokimia dari tanaman kedelai dalam kondisi cekaman kekeringan dan kondisi optimum serta dengan melakukan analisis fisiologis dan biokimia tanaman maka mekanisme toleransi kekeringan dari tanaman kedelai akan diketahui. Pemahaman tentang mekanisme toleransi terhadap cekaman kekeringan pada

kedelai ini akan sangat membantu program pemuliaan kedelai untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan.

1. Karakterisasi fisiologis (prolin dan gula total terlarut) untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan pada tanaman kedelai yang mengalami stres kekeringan pada fase vegetatif.

Analisis fisiologis untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan dilakukan untuk mengetahui proses fisiologis yang mendasari toleransi terhadap cekaman kekeringan. Analisis yang dilakukan dan diharapkan agar dapat menjawab tujuan tersebut di atas, meliputi: kandungan prolin dan kandungan gula total.

Analisis fisiologis untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan akan dilakukan pada populasi tanaman kedelai yang ditanam dalam kondisi stres PEG dan non-stres PEG. Analisis dilakukan pada 2 genotipe kelompok toleran, dan 2 genotipe kelompok peka terhadap cekaman kekeringan. Masing-masing kelompok untuk masing-masing karakter fisiologis, diulang 2x.

Analisis dilakukan menggunakan berbagai metode standar untuk melakukan analisis terhadap berbagai karakter fisiologis tanaman. Kadar prolin dianalisis berdasarkan metode Bates *et al.* (1973), kandungan gula total daun dari tanaman yang diuji dianalisis berdasarkan metode Irigoyen *et al.* (1992).

Untuk mencapai tujuan yang diinginkan, pengujian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Analisis kandungan prolin

- Kadar prolin dianalisis berdasarkan metode Bates *et al.* (1973). Daun dari tanaman kedelai dari kelompok toleran, medium dan peka yang mengalami stres dan non-stres kekeringan pada fase pertumbuhan vegetatif ditimbang seberat 2 g, digerus dan dihomogenasi dengan 10 ml asam sulfosalisilat (3%). Campuran disentrifugasi pada $9000 \times g$ selama 15 menit, supernatan yang didapat dipisahkan.
- Untuk mendeteksi prolin, 2 ml supernatan yang didapat direaksikan dengan 2 ml larutan asam ninhidrin dan asam asetat glacial dalam tabung reaksi dan dipanaskan pada penangas air dengan suhu 100°C selama 60 menit. Reaksi diakhiri dengan menginkubasikan larutan dalam es selama 5 menit.

- Hasil reaksi diekstraksi dengan 4 ml toluene sehingga terbentuk kromofom. Kromofom yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm.
- Sebagai standart digunakan DL-proline (Sigma) 2.5-40 μg yang dilarutkan dalam asam sulfosalisilat (3%). Kadar prolin dinyatakan sebagai $\mu\text{mol/g}$ berat basah embrio somatik.

Analisis kandungan gula total terlarut

- Kadar gula total dianalisis berdasarkan metode Irigoyen *et al.* (1992). Daun dari tanaman kedelai dari kelompok toleran, medium dan peka kekeringan yang mengalami stres kekeringan yang mengalami stres dan non-stres kekeringan pada fase pertumbuhan vegetatif ditimbang seberat 2 g, digerus dan diekstrak dengan 20 ml alkohol panas (80%). Campuran disentrifugasi pada $9000 \times g$ selama 15 menit, supernatan yang didapat dipisahkan.
- Volume supernatan ditera kembali sehingga mencapai volume 50 ml. Untuk mendeteksi gula total, 1 ml supernatan direaksikan dengan 5 ml reagen anthrone (100 mg anthrone, 50 ml 95% H_2SO_4) pada suhu 100°C selama 10 menit. Reaksi diakhiri dengan menginkubasikan larutan dalam es selama 5 menit.
- Kandungan gula total ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm.
- Sebagai standard digunakan 1 ml larutan gula (40-320 μg) yang direaksikan dengan 5 ml reagen anthrone.

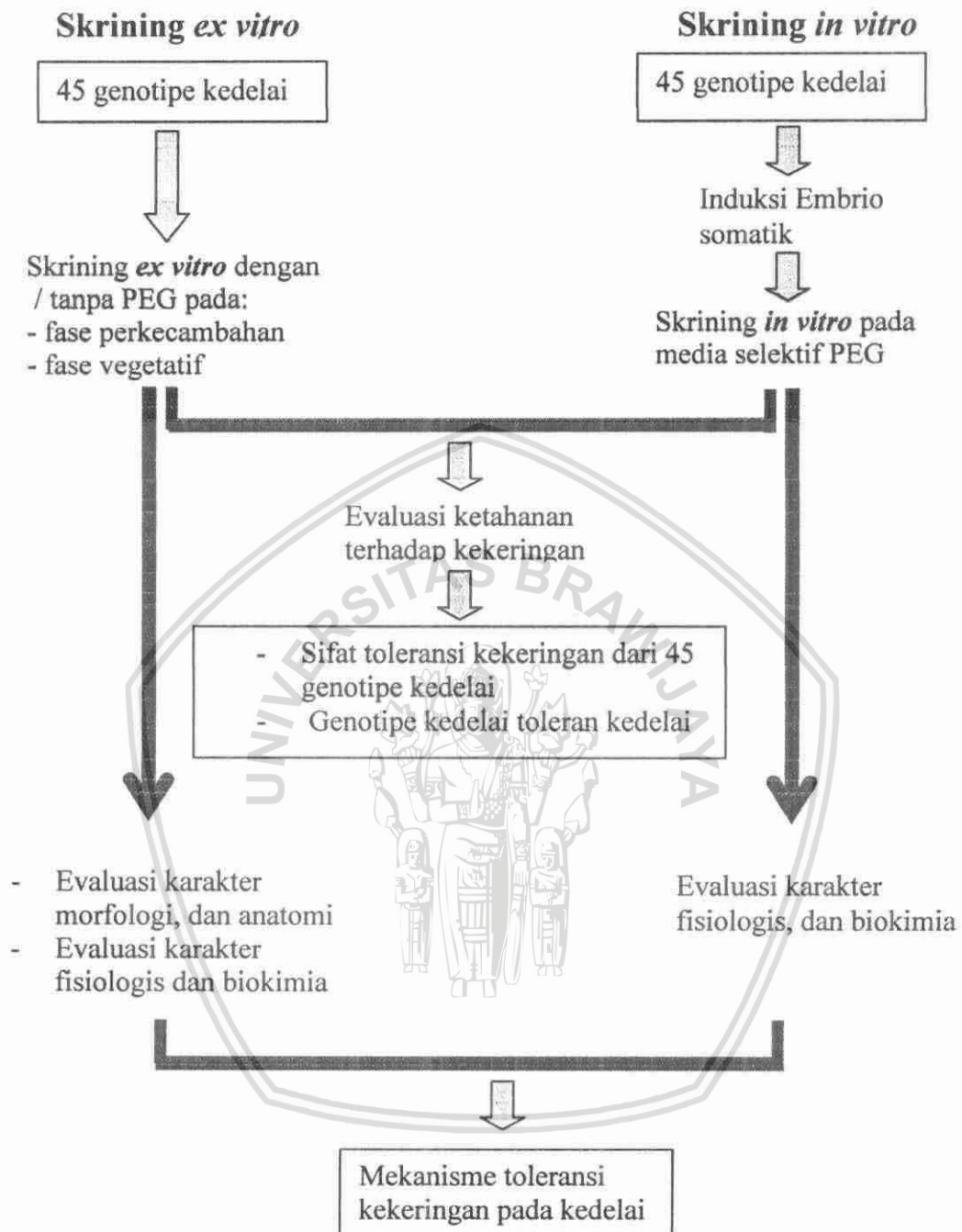
2. Karakterisasi perubahan aktivitas enzim antioksidan (SOD, CAT dan POX) sebagai respon terhadap stres kekeringan

Analisis aktivitas enzim antioksidan pada hipokotil dan akar kecambah serta daun dan akar dari tanaman kedelai yang mengalami stress kekeringan dilakukan untuk mengetahui proses biokimia yang mendasari toleransi terhadap cekaman kekeringan pada kedelai. Analisis yang dilakukan dan diharapkan agar dapat menjawab tujuan tersebut di atas, meliputi: aktivitas enzim SOD, CAT dan POX. Analisis biokimia untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan akan dilakukan pada populasi hipokotil dan akar kecambah serta daun dan akar dari tanaman kedelai yang ditanam di bawah kondisi stres PEG dan non-stres PEG.

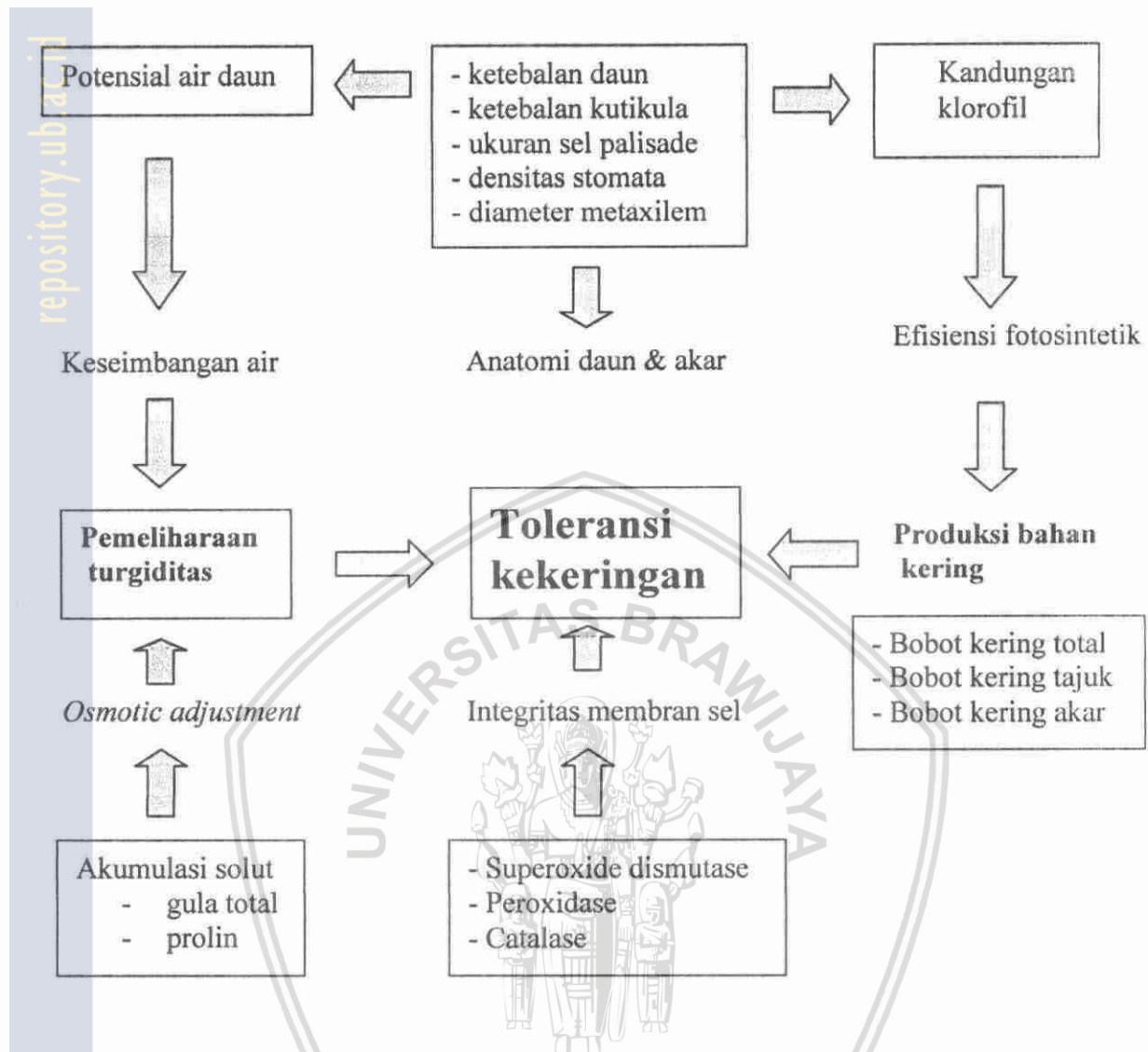
Analisis dilakukan pada 3 genotipe kelompok toleran, 3 genotipe kelompok peka terhadap cekaman kekeringan. Masing-masing kelompok untuk masing-masing karakter biokimia, diulang 2x.

Untuk mencapai tujuan yang diinginkan, pengujian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- ▶ **Ekstraksi enzim:** Kecambah atau daun dari tanaman kedelai dari kelompok toleran, dan peka yang mengalami stres dan non-stres kekeringan ditimbang seberat 0,2 g, digerus dan dihomogenasi dengan 1 ml buffer potasium fosfat 0,1M (pH 6,8) yang mengandung 0,1 mM EDTA dan 100 mg polyvinyl pyrolidone.
- ▶ Homogenat disentrifugasi pada 15.000 g selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang didapat digunakan untuk uji enzim katalase (CAT, peroksidase (POX) dan superoksida dismutase (SOD).
- ▶ Aktivitas katalase dan peroksidase diuji menurut metode Chance dan Maehly (1955).
- ▶ **Aktivitas katalase (CAT)**
Campuran uji untuk CAT terdiri dari 3,0 ml buffer phosphate (pH 6,8), 1,0 ml (30 mM) H₂O₂ dan 1,0 ml ekstrak enzim. Reaksi diakhiri dengan menambahkan 10 ml H₂SO₄ 2% (v/v) diikuti dengan 1 ml 0,01 KMnO₄ untuk menentukan kuantitas residu H₂O₂. Aktivitas katalase (CAT) diuji dengan mengukur kecepatan dekomposisi H₂O₂.
- ▶ **Aktivitas peroksidase (POX)**
Aktivitas peroksidase (POX) ditentukan dengan kecepatan perubahan absorbansi pada panjang gelombang 479 nm selama 1 menit dalam campuran reaksi yang terdiri dari 2,1 ml (0,1 M) buffer phosphate (pH 6,8), 0,3 guaiacol 1,6%, 0,3 ml H₂O₂ 0,04 M dan 0,3 ml ekstrak enzim..
- ▶ **Aktivitas superoksida dismutase (SOD)**
Uji SOD dilakukan berdasarkan metode Giannopolitis dan Ries (1977). 3,0 ml campuran reaksi terdiri dari 2,5 ml Tris buffer (pH 8,9), 0,1 ml Bovine serum albumin (3,3x10⁻² % w/v), 0,1 ml NBT (6 mM), 0,1 ml riboflavin (600 uM dalam 5 mM potasium hydroxide) dan 0,2 ml ekstrak enzim. Campuran reaksi disinari dalam tabung gelas. Satu unit aktivitas SOD ditentukan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menyebabkan 50% penghambatan penurunan NBT pada panjang gelombang 560 nm.



Gambar 4.1. Konsep dan pendekatan penelitian dalam PHB XIII. Skrining *ex vitro* dan *in vitro* menghasilkan informasi mengenai tingkat toleransi kekeringan dari 45 genotipe kedelai dan mendapatkan varietas kedelai yang toleran kekeringan, sedangkan evaluasi karakter morfologi, anatomis, fisiologis dan biokimia menghasilkan mekanisme toleransi kekeringan pada kedelai.



Gambar 4.2. Karakter morfologis, anatomis, fisiologis dan biokimia yang dievaluasi dalam Kegiatan Penelitian Hibah Bersaing XIII untuk mengetahui mekanisme toleransi kekeringan pada kedelai.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

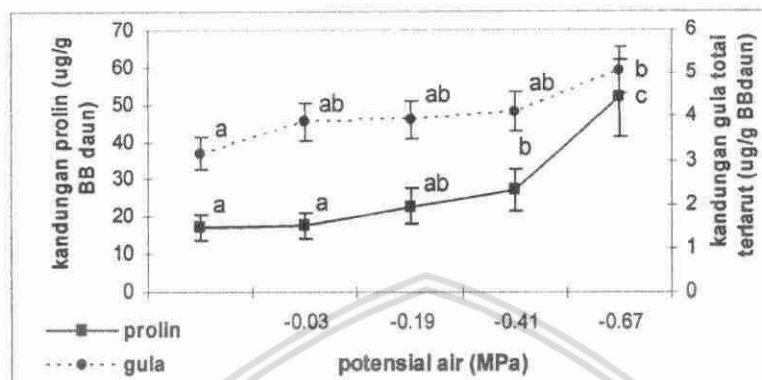
5.1. Pengaruh stres kekeringan pada fase vegetatif terhadap kandungan prolin dan gula total terlarut daun pada beberapa genotip kedelai.

Salah satu mekanisme toleransi tanaman dalam menghadapi stres kekeringan adalah melakukan perubahan aktivitas fisiologi, yaitu dengan mengakumulasi zat terlarut seperti prolin dan gula total terlarut. Akumulasi zat terlarut tersebut membantu tanaman dalam mempertahankan diri terhadap kondisi kekeringan (Sunarpi, 2003). Prolin berperan sebagai pencegah dehidrasi dan kerusakan sel dengan menyeimbangkan potensial osmotik sitoplasma dengan lingkungan sekitarnya (Al-Bahrany, 2002), membantu meningkatkan toleransi terhadap kekeringan dengan bertindak sebagai penyimpan nitrogen atau sebagai zat terlarut yang meningkatkan potensial solut dalam sitoplasma, sehingga air akan masuk menuju sitoplasma (Gardner dkk.,1991). Sedangkan gula berfungsi menjaga stabilitas membran sel dan melindungi protein (Darbyshire, 1974) serta meningkatkan potensial solut daun sehingga membantu turgiditas ketika tanaman mengalami cekaman kekeringan (Widoretno dan Sudarsono 2004).

Evaluasi kandungan prolin dan kandungan gula total terlarut dalam kondisi stres dan non-stres kekeringan dilakukan pada lima genotip kedelai yang mempunyai tingkat toleransi yang berbeda, yaitu Dieng dan MLG2805 dari kelompok toleran, Petek dari kelompok medium serta Tambora dan Galunggung dari kelompok peka. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan prolin dan gula total terlarut dalam daun mengalami akumulasi seiring dengan menurunnya potensial air, akan tetapi akumulasi prolin lebih tinggi daripada akumulasi gula total terlarut. Kandungan prolin dan gula total terlarut memiliki kecenderungan mengalami peningkatan mulai dari potensial air -0,03 MPa sampai -0,67 MPa. Akan tetapi peningkatan secara signifikan terjadi pada potensial air -0,67 MPa, karena pada potensial air tersebut kedua zat terlarut tersebut mengalami peningkatan yang tinggi terutama pada prolin (Gambar 5.1.1).

Pada kondisi cekaman kekeringan, akumulasi prolin meningkat karena proses sintesis prolin dari asam glutamat meningkat, sedangkan proses degradasi membentuk asam glutamat menurun. Dengan demikian, konsentrasi prolin terus meningkat seiring dengan semakin besarnya cekaman kekeringan yang telah diberikan (Caplan dan Lyer, 1998). Sedangkan peningkatan gula pada kondisi kekeringan terjadi karena pati yang

ada di protoplasma dihidrolisis menjadi gula. Akan tetapi gula yang dihasilkan ditranslokasikan ke titik-titik tumbuh untuk membentuk tunas, daun maupun batang, untuk menahan kelayuan tanaman akibat cekaman kekeringan, sehingga akumulasi gula dalam daun tidak sebesar akumulasi prolin (Salisbury dan Ross, 1995).

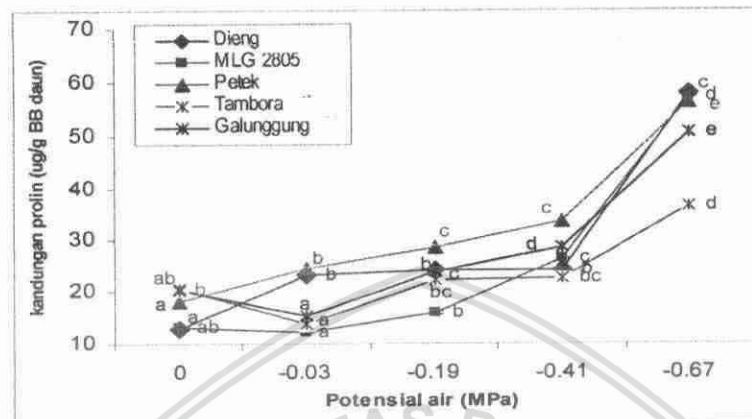


Gambar 5.1.1 Pengaruh stres kekeringan pada kandungan prolin dan gula total terlarut pada daun kedelai

Berdasarkan penelitian Jhana dkk. (2001) dan Johnson dkk. (1995) peningkatan kandungan prolin pada daun kacang tanah dan gula pada daun gandum dapat digunakan untuk skrining tingkat toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan. Tanaman yang toleran terhadap cekaman kekeringan mengalami peningkatan kandungan prolin dan gula lebih tinggi daripada tanaman yang peka. Sebaliknya, hasil penelitian Newton dkk. (1986) dan Newton dkk. (1985) menunjukkan kandungan prolin dan gula total terlarut pada kalus dari varietas sorghum yang toleran terhadap cekaman kekeringan mengalami peningkatan lebih rendah dibandingkan dengan varietas yang peka. Hal ini dikarenakan, pada kondisi cekaman kekeringan proses penurunan potensial air kalus pada varietas peka terjadi lebih cepat daripada varietas yang toleran, sehingga mengakibatkan proses sintesis prolin dan gula total terlarut meningkat lebih tinggi. Prolin dan gula total terlarut pada tanaman sorghum berperan sebagai *osmoprotectant*. Dengan semakin meningkatnya prolin dan gula total terlarut pada kalus diharapkan mampu mempertahankan tekanan turgor dengan mengatur potensial osmotik pada kalus, sehingga kalus yang peka dapat melakukan pertumbuhan walaupun dalam kondisi kekeringan.

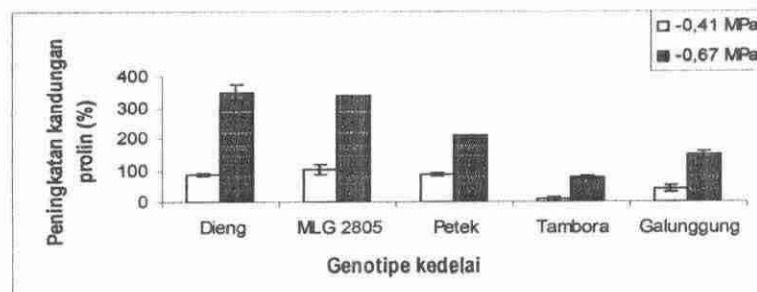
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, penurunan potensial air mengakibatkan peningkatan akumulasi prolin pada 5 genotipe kedelai yang diujikan. Akan tetapi, masing-masing genotipe memberikan respon akumulasi prolin yang bervariasi.

Peningkatan kandungan prolin paling tinggi terjadi pada potensial -0.67 MPa (Gambar 5.1.2). Pola peningkatan kandungan prolin pada varietas toleran Dieng dan MLG2805 serta varietas medium Petek membentuk pola yang teratur. Sedangkan pola peningkatan prolin pada varietas peka Galunggung dan Tambora, menunjukkan pola yang tidak teratur dengan mengalami penurunan kandungan prolin pada potensial air $-0,03$ MPa.



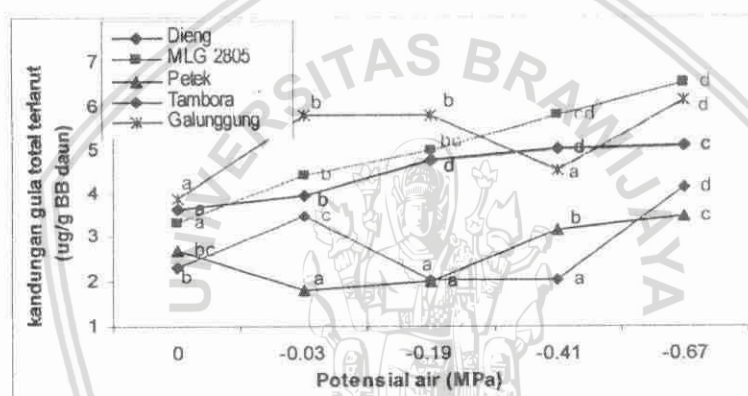
Gambar 5.1.2 Pengaruh stres kekeringan pada kandungan prolin dari daun kedelai genotipe toleran, medium dan peka

Pada potensial air $-0,67$ MPa peningkatan kandungan prolin antara genotipe toleran (Dieng dan MLG2805), medium toleran (Petek) serta peka (Tambora dan Galunggung) pada potensial air $-0,67$ MPa mengalami perbedaan. Kandungan prolin pada genotipe toleran dan medium meningkat lebih tinggi dibandingkan dengan genotipe peka. Genotipe Dieng dan MLG 2805 mengalami peningkatan prolin lebih dari 300% dibandingkan dengan kandungan prolin pada kontrol. Pada varietas medium Petek kandungan prolin meningkat lebih dari 200%, sedangkan varietas peka Tambora dan Galunggung mengalami peningkatan kandungan prolin kurang dari 150% (Gambar 5.1.3).



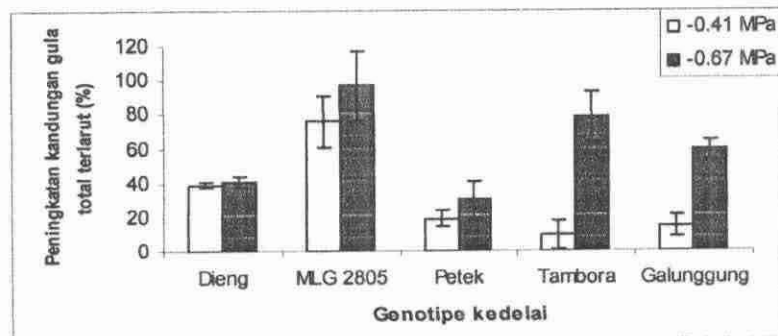
Gambar 5.1.3 Peningkatan kandungan prolin genotipe toleran, medium dan peka pada potensial air $-0,41$ MPa dan $-0,67$ MPa

Penurunan potensial air juga meningkatkan kandungan gula terlarut pada daun beberapa genotipe kedelai. Peningkatan kandungan gula total terlarut pada 5 genotipe kedelai yang diujikan menghasilkan pola yang bervariasi, antara varietas yang toleran, medium dan peka (Gambar 5.1.4). Varietas toleran Dieng dan MLG 2805 memiliki pola peningkatan yang teratur. Varietas medium Petek mengalami penurunan kandungan gula pada potensial air -0.03 MPa dan -0.19 MPa, namun demikian polanya tidak terlalu mengalami fluktuasi. Sedangkan varietas peka Tambora dan Galunggung mengalami fluktuasi lebih besar dibandingkan dengan varietas toleran dan medium. Secara umum kandungan gula total terlarut mengalami peningkatan mulai dari potensial air -0.03 sampai -0.67 MPa. Peningkatan paling tinggi terjadi pada potensial air -0.67 MPa, kecuali pada varietas Dieng. Pada varietas Dieng peningkatan paling tinggi terjadi pada potensial air -0.41 MPa.



Gambar 5.1.4. Pengaruh stres kekeringan pada kandungan gula total terlarut dari daun kedelai genotipe toleran, medium dan peka.

Pada kandungan gula total terlarut peningkatan paling tinggi juga terjadi pada potensial air -0.67 MPa. Pada varietas toleran Dieng dan MLG2805, kandungan gula total terlarut mengalami peningkatan sebesar 40 % dan 97%. Pada varietas medium Petek peningkatan kandungan gula total terlarut berada pada posisi paling rendah, sedangkan varietas peka Tambora dan Galunggung mengalami peningkatan lebih besar dibandingkan dengan varietas toleran (Gambar 5.1.5). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan kandungan gula total terlarut dalam kondisi cekaman kekeringan tidak berkorelasi dengan tingkat toleransi terhadap kekeringan varietas kedelai di lapang.



Gambar 5.1.5 Peningkatan kandungan gula total terlarut genotipe toleran, medium dan peka pada potensial air $-0,41$ MPa dan $-0,67$ Mpa

Peningkatan akumulasi prolin dan gula total pada daun kedelai menyebabkan tanaman lebih bersifat toleran terhadap cekaman kekeringan. Hal ini dikarenakan semakin meningkatnya akumulasi prolin dan gula total terlarut pada daun kedelai, potensial air pada daun lebih negatif (mengalami penurunan) dibandingkan dengan potensial air pada tanah, sehingga air melakukan pergerakan menuju ke daerah yang memiliki potensial lebih rendah, yaitu dari tanah menuju ke daun tanaman. Dengan demikian, tanaman mampu mempertahankan turgiditas daun ketika mengalami cekaman kekeringan (Salisbury dan Ross, 1995., Belhassen dan Monneveux, 1996).

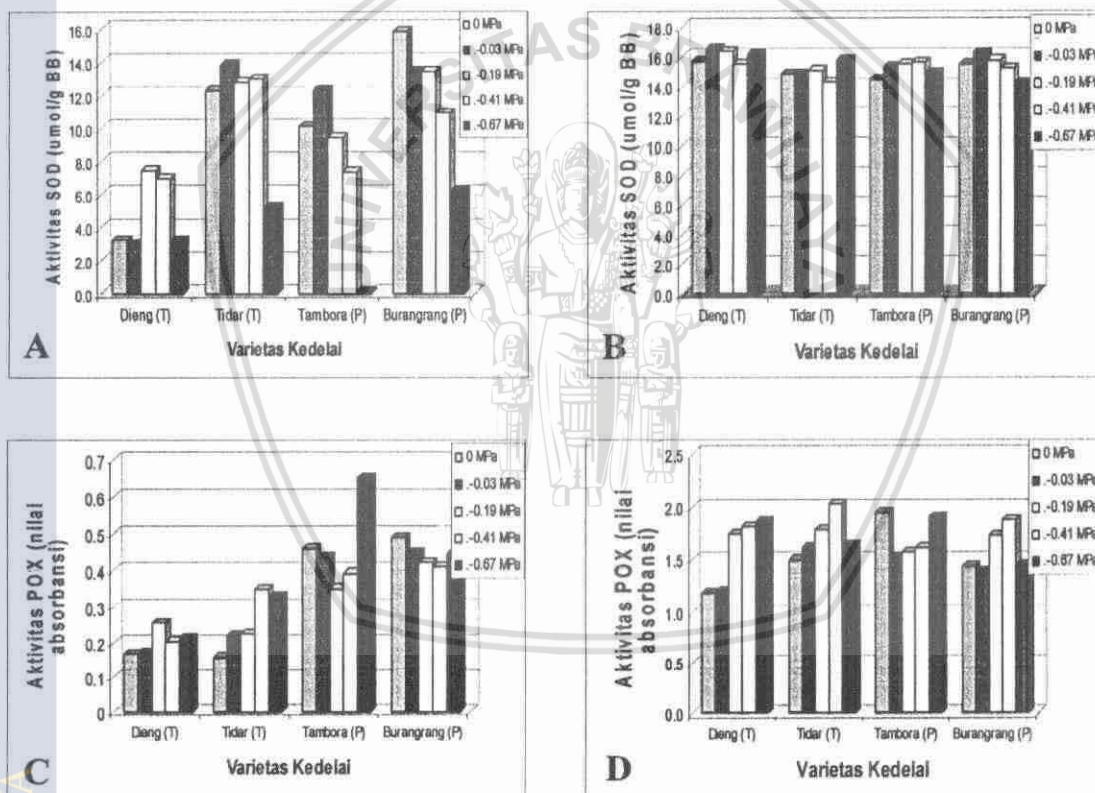
5.2. Pengaruh stres kekeringan pada fase pertumbuhan vegetatif terhadap aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dan peroksidase (POX)

Stres kekeringan pada fase pertumbuhan vegetatif yang disimulasi dengan penambahan PEG dalam media tanam berpengaruh terhadap aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dan POX (POX). Perubahan aktivitas ketiga enzim tersebut di bawah kondisi stres kekeringan antara jaringan daun dan akar berbeda (Gambar 5.2.1). Aktivitas SOD pada jaringan akar lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan daun tetapi aktivitas POX pada jaringan akar lebih rendah dibandingkan dengan jaringan daun (Gambar 5.2.1).

Perubahan aktivitas SOD dan POX pada jaringan daun dan akar yang mengalami stres kekeringan selama pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh varietas kedelai yang diuji dan besarnya penurunan potensial air. Aktivitas SOD pada jaringan daun dari varietas Dieng dan Tidar mengalami peningkatan pada penurunan potensial air sampai -

0,41 Mpa, sedangkan peningkatan aktivitas SOD pada varietas Tambora hanya terjadi pada penurunan potensial air -0,03 Mpa. Aktivitas SOD pada varietas Burangrang di bawah kondisi stres justru mengalami penurunan. Pada potensial air -0,67, aktivitas SOD daun pada semua varietas kedelai yang diuji mengalami penurunan (Gambar 5.2.1A).

Di bawah kondisi stress kekeringan, aktivitas SOD pada jaringan akar tidak menunjukkan perubahan yang nyata. Aktivitas SOD pada kondisi non-stres berkisar antara 14,5 – 15,7 $\mu\text{mol/g BB}$, sedangkan pada kondisi stres berkisar antara 14,3 – 16,5 $\mu\text{mol/gBB}$ (Gambar 5.2.1B). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perubahan aktivitas enzim SOD pada jaringan daun dan akar di bawah kondisi stress kekeringan antara varietas toleran dan peka tidak menunjukkan perbedaan yang jelas.



Gambar 5.2.1. Pengaruh penurunan potensial air selama pertumbuhan vegetatif terhadap aktivitas enzim SOD dan POX pada jaringan daun (A dan C) dan akar (B dan D) dari empat varietas kedelai.

Aktivitas POX pada jaringan daun dan akar dari tanaman kedelai yang mengalami stres kekeringan pada fase vegetatif juga mengalami perubahan. Dalam penelitian ini besarnya aktivitas POX masih belum dapat dihitung, masih ditunjukkan

dengan nilai absorbansi dari besarnya H_2O_2 yang masih tersisa. Sehingga semakin kecil nilai absorbansi semakin sedikit H_2O_2 yang tersisa atau semakin besar H_2O_2 yang dipakai atau semakin tinggi aktivitas POX.

Penurunan potensial air pada fase pertumbuhan vegetatif kedelai juga dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim POX pada jaringan daun dan akar. Perubahan aktivitas enzim POX pada jaringan daun pada tanaman yang mengalami stres kekeringan bervariasi diantara varietas kedelai yang diuji. Penurunan potensial air menyebabkan penurunan aktivitas enzim POX pada varietas toleran Dieng dan Tidar, dan semakin besar penurunan potensial air media tanam semakin besar pula penurunan aktivitas enzim POX pada jaringan daun. Pada varietas peka Tambora dan Burangrang, penurunan potensial air sampai -0.41 Mpa menyebabkan peningkatan aktivitas POX pada jaringan daun. Penurunan aktivitas POX pada varietas burangrang mulai terjadi pada penurunan potensial -0.67 . Sedangkan aktivitas POX pada varietas Burangrang pada potensial air -0.67 masih mengalami peningkatan (Gambar 5.2.1C).

Penurunan potensial air pada media tanam sampai -0.67 Mpa menyebabkan penurunan aktivitas POX pada jaringan akar pada varietas toleran Dieng dan Tidar dan varietas peka Burangrang, tetapi meningkatkan aktivitas POX pada varietas peka Tambora (Gambar 5.2.1D).

Penurunan potensial air selama fase pertumbuhan vegetatif kedelai dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim antioksidan SOD dan POX. Perubahan aktivitas enzim-enzim ini di bawah kondisi stres kekeringan sangat dipengaruhi oleh varietas kedelai yang diuji dan besarnya penurunan potensial air. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan potensial air sampai $-0,41$ Mpa menyebabkan peningkatan aktivitas SOD pada jaringan daun dari varietas toleran Dieng dan Tidar tetapi justru menyebabkan penurunan pada varietas peka Tambora dan Burangrang. Sebaliknya penurunan potensial air sampai $-0,41$ dapat menurunkan aktivitas SOD pada jaringan daun dari varietas toleran tetapi pada varietas peka justru mengalami peningkatan. Aktivitas SOD dan POX pada jaringan akar antara varietas toleran dan peka tidak menunjukkan pola yang berbeda.

Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas SOD dan POX pada jaringan daun di bawah stress kekeringan selama pertumbuhan vegetatif berkaitan dengan tingkat toleransi varietas kedelai.. Peningkatan aktivitas SOD pada jaringan daun dari varietas kedelai toleran yang mengalami stres kekeringan selama pertumbuhan vegetatif merupakan reaksi adaptif tanaman terhadap stress kekeringan untuk meningkatkan kemampuan dalam menghilangkan ROS. Peningkatan aktivitas enzim antioksidan ini

pada varietas kedelai yang toleran menegaskan adaptasi fisiologi yang lebih baik dari varietas ini di bawah kondisi kekeringan.

Sedangkan penurunan aktivitas SOD pada jaringan daun pada penurunan potensial air yang tinggi atau pada varietas tanaman sebagai pertanda toxicosis tanaman. Perbedaan perubahan aktivitas enzim SOD dan POX antara varietas toleran dan peka ini menunjukkan adanya perbedaan kemampuan beradaptasi dari varietas tersebut terhadap stres kekeringan yang terjadi selama pertumbuhan vegetatif. Sehingga perubahan aktivitas SOD pada jaringan daun yang mengalami stres kekeringan dapat digunakan sebagai indikator dari toleransi genotip kedelai terhadap stres kekeringan.

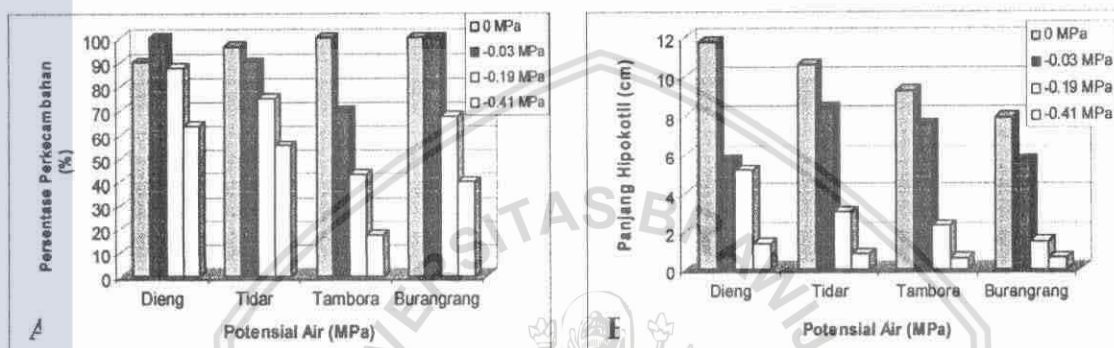
Stres kekeringan merupakan salah satu faktor lingkungan yang sangat penting dalam mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Tanaman dapat merespon dan beradaptasi terhadap stres kekeringan dengan cara mengubah metabolisme seluler. Stres kekeringan dapat menginduksi ROS yang dapat menyebabkan kerusakan lipid membran, protein dan DNA. SOD merupakan enzim antioksidan yang dapat melindungi sel terhadap kerusakan oksidatif tersebut dan mempunyai peran penting dalam meningkatkan resistensi tanaman terhadap stres oksidatif.

Peningkatan aktivitas SOD di bawah kondisi stres abiotik juga telah dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya, yaitu pada tanaman *Ulmus pumila L.* yang mengalami stres garam (Song *et al.*, 2006), tanaman jagung yang mengalami stres air (Jiang dan Zhang, 2002) dan tanaman *Vigna radiata* yang mengalami stres AI (Panda *et al.*, 2003).

Adanya perbedaan aktivitas enzim antioksidan yang mengalami stres abiotik antara varietas toleran dan peka telah banyak dilaporkan. Hasil penelitian Acar *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa aktivitas SOD pada kultivar barley yang resisten terhadap kekeringan lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas SOD dari kultivar barley yang peka. Sedangkan Das *et al.*, (2004) melaporkan bahwa aktivitas enzim CAT dan POX pada kultivar padi yang toleran lebih tinggi dibandingkan dengan kultivar yang peka.

5.3. Pengaruh stres kekeringan terhadap pertumbuhan dan aktivitas enzim SOD, CAT dan POX pada kecambah kedelai

Kondisi stres kekeringan yang disimulasi dengan penambahan PEG pada media perkecambahan dapat menghambat perkecambahan kedelai. Semakin tinggi PEG yang ditambahkan dalam media atau semakin tinggi penurunan potensial air dalam media tanam semakin tinggi pula penghambatan perkecambahan kedelai. Penghambatan perkecambahan ditunjukkan dengan terjadinya penurunan persentase perkecambahan dan penghambatan pertumbuhan panjang hipokotil. Penghambatan pertumbuhan kecambah kedelai mulai terjadi pada penurunan potensial air $-0,03$ Mpa (Gambar 5.3.1).



Gambar 5.3.1. Pengaruh penurunan potensial air dalam media tanam terhadap perkecambahan beberapa varietas kedelai. A. Persentase perkecambahan, B panjang hipokotil

Setiap varietas kedelai uji mempunyai respon perkecambahan yang berbeda terhadap penurunan potensial air. Penurunan potensial 0.03 Mpa sudah dapat menghambat perkecambahan varietas Tambora. Perkecambahan biji pada varietas Burangrang mulai terhambat pada penurunan potensial air -0.41 Mpa, sedangkan perkecambahan pada varietas Dieng, dan Tidar terhambat pada penurunan potensial air -0.67 Mpa (Tabel 1, Lampiran). Hasil seleksi *in vitro* dan *ex vitro* yang dilakukan pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa varietas Dieng, dan Tidar termasuk dalam kelompok toleran kekeringan sedangkan varietas Tambora dan Burangrang termasuk dalam kelompok peka. Hal ini menunjukkan ada korelasi antara tingkat toleransi kekeringan dari varietas kedelai dengan kemampuan berkecambah biji pada media yang mengandung PEG.

Berbeda dengan persentase perkecambahan, penghambatan pertumbuhan hipokotil tidak berkorelasi dengan tingkat toleransi terhadap stres kekeringan dari varietas kedelai. Varietas toleran Dieng mengalami penghambatan pertumbuhan hipokotil pada penurunan potensial air -0.03 Mpa, sedangkan varietas toleran Tidar dan varietas peka

Burangrang dan Tambora baru mengalami penghambatan pertumbuhan hipokotil pada penurunan potensial air pada media tanam -0.19 Mpa (Tabel 1, Lampiran)

Respon perkecambahan yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan tingkat homeostatis tiap varietas dalam merespon besarnya perubahan lingkungan/stres kekeringan yang disimulasikan dengan PEG. Perbedaan homeostatis ini dikendalikan secara genetik dan menentukan adaptasi tanaman terhadap stres lingkungan. Menurut Salisbury dan Ross (1992), hal ini disebabkan karena adanya keragaman genetik dalam spesies, sehingga saat tekanan seleksi diberikan, respon dari tiap varietas juga berbeda. Kimball (2000) menyatakan gen yang diwarisi suatu individu menentukan potensi yang dapat dicapainya sejalan dengan pertumbuhan dan perkembangannya, sedangkan lingkungan menentukan sampai dimana derajat potensi ini akan tercapai. Yamaguchi dkk., (1994) telah berhasil mengisolasi 25 gen yang responsif terhadap kondisi kekurangan air pada tanaman *Arabidopsis thaliana* L., dan menganalisis ekspresi gen-gen tersebut. Hasilnya gen-gen tertentu hanya responsif terhadap kondisi lingkungan tertentu saja. Gen rd29A responsif terhadap kondisi cekaman salinitas, sedangkan gen Atmyb2 responsif terhadap stres air dan ABA.

Tanaman mengembangkan suatu strategi dalam menghadapi cekaman kekeringan yang meliputi *escape* (lolos), *avoidance* (menghindar) dan *tolerance* (tahan). Pada tanaman *escaper*, tanaman akan mengurangi paparan kekeringan dengan segera menyelesaikan siklus hidupnya. Aspek ketahanannya meliputi perkembangan daun yang mengecil dan tebal dengan lapisan kutikula, penurunan luas daun dan penutupan stomata. Tanaman *avoidance* memiliki strategi adaptasi dengan mengkonservasi air kemudian menyuplai air ke organ –organ tanaman di atas tanah, yaitu dengan memanjangkan akar tanaman. Tanaman toleran kekeringan mempunyai mekanisme tersendiri yang berkaitan dengan sifat genetik yang mengekspresikan sifat toleran terhadap cekaman kekeringan (Zaharieva dkk., 2001).

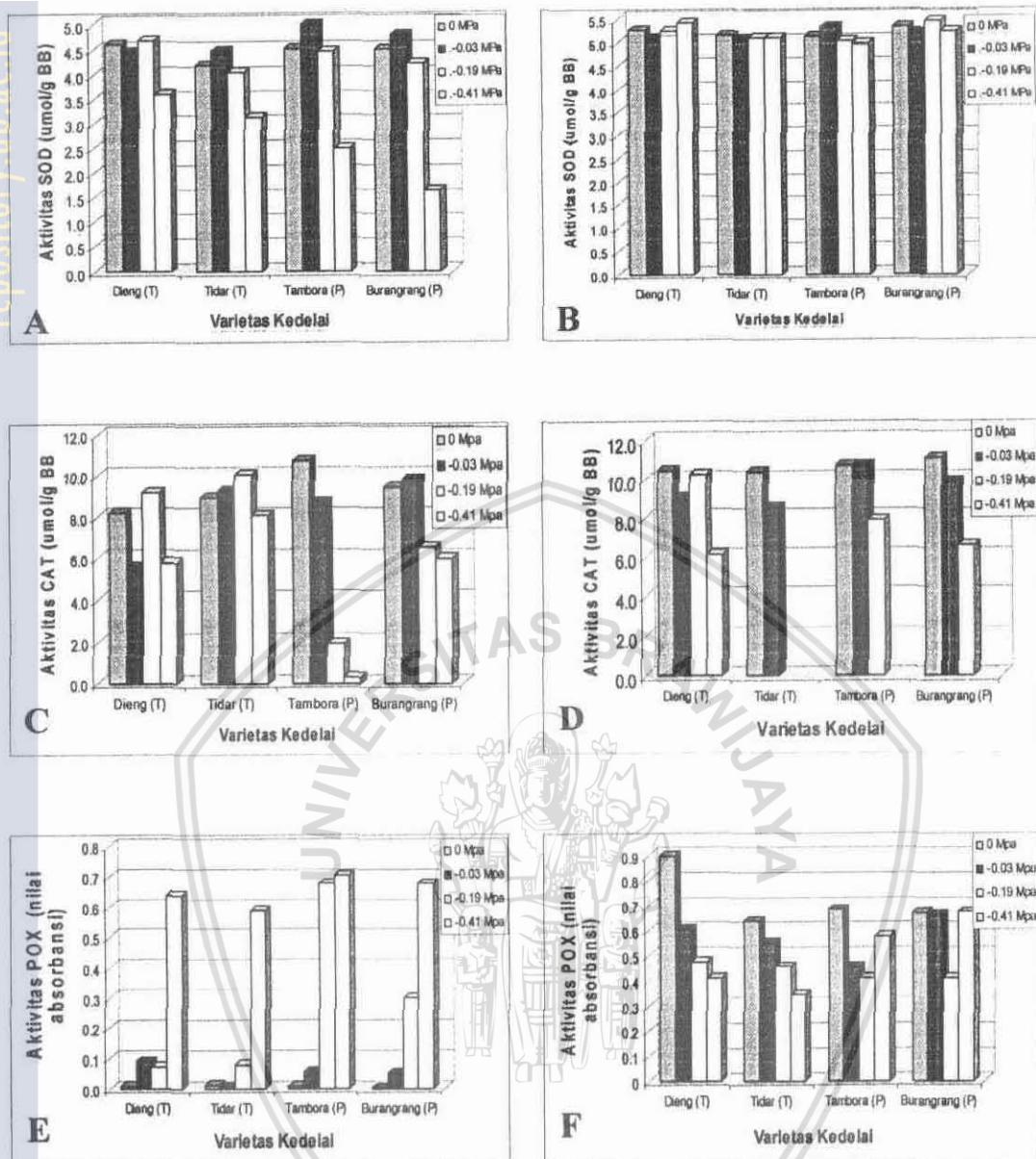
Penurunan potensial air pada media tanam juga dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim SOD, CAT dan POX pada hipokotil dan akar kecambah kedelai. Ada perbedaan antara aktivitas ke tiga enzim tersebut pada jaringan hipokotil dan akar kecambah. Akar menunjukkan aktivitas SOD dan CAT yang lebih tinggi dibandingkan dengan hipokotil (Gambar 5.3.2 ABCD). Aktivitas SOD dan CAT pada jaringan akar berkisar antara 5,1-5,2 $\mu\text{mol/g BB}$ dan 6,2-10,5 $\mu\text{mol/gBB}$, sedangkan aktivitas SOD dan CAT pada hipokotil berkisar 2,8-4,4 $\mu\text{mol/gBB}$ dan 4,8-9,2 $\mu\text{mol/g BB}$.

Perubahan aktivitas enzim SOD, CAT dan POX pada kecambah yang mengalami stres kekeringan bervariasi diantara 4 varietas kedelai yang diuji. Aktivitas SOD pada jaringan hipokotil dari pada varietas Tidar, Tambora dan Burangrang mengalami peningkatan pada penurunan potensial air $-0,03$ Mpa, sedangkan aktivitas SOD pada varietas Dieng mengalami peningkatan pada potensial air $-0,19$ Mpa. Pada potensial air $-0,67$ Mpa, aktivitas SOD pada semua varietas kedelai mengalami penurunan. Pada potensial air $-0,67$ Mpa, varietas yang mempunyai tingkat toleransi terhadap stress kekeringan lebih tinggi (Dieng, Tidar) mengalami penurunan aktivitas SOD yang lebih kecil dibandingkan dengan varietas yang lebih peka (Tambora dan Burangrang) (Gambar 5.3.2A). Berbeda dengan aktivitas SOD pada jaringan hipokotil, perubahan aktivitas SOD pada jaringan akar kecambah dalam kondisi stres nampak tidak nyata. (Gambar 5.3.2B).

Aktivitas CAT kecambah dalam kondisi stres kekeringan juga bervariasi diantara varietas kedelai yang diuji. Varietas peka Tambora dan Burangrang mengalami penurunan aktivitas CAT pada penurunan potensial air $0,03$ Mpa sampai $-0,67$ Mpa. Semakin rendah potensial air semakin tinggi penurunan aktivitas CAT pada jaringan hipokotil maupun akar. Aktivitas CAT pada varietas toleran menurun dengan potensial air $-0,03$ Mpa dan kemudian meningkat pada potensial air $-0,19$ Mpa (Gambar 5.3.2C,D)

Penurunan potensial air pada media tanam menyebabkan penurunan aktivitas enzim POX pada hipokotil kecambah pada semua varietas kedelai yang diuji. Semakin besar penurunan potensial air semakin besar pula penurunan aktivitas POX. Dari penelitian ini nampak bahwa tidak ada perbedaan penurunan aktivitas POX antara varietas yang toleran (Dieng dan Tidar) dengan varietas yang peka (Tambora dan Burangrang) (Gambar 5.3.2E).

Berbeda dengan aktivitas enzim POX pada hipokotil kecambah, penurunan potensial air justru menyebabkan peningkatan aktivitas POX pada akar kecambah pada semua varietas kedelai yang diuji (Gambar 5.3.2E). Tetapi pada potensial air $-0,41$ Mpa, aktivitas POX akar dari varietas peka Burangrang dan Tambora mengalami peningkatan sedangkan pada varietas toleran Dieng dan Tidar mengalami penurunan (Gambar 5.3.2F).



Gambar 5.3.2. Pengaruh penurunan potensial air terhadap aktivitas enzim SOD, CAT dan POX pada jaringan hipokotil (A,C,E) dan akar (B,D,F) kecambah dari empat varietas kedelai.

Stres kekeringan selain dapat menginduksi akumulasi asam absisat, prolin dan gula, juga dapat menyebabkan peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) atau senyawa oksigen reaktif seperti *superoxide radical* (O_2^-), *hydroxyl radical* (OH), *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *alkoxyl radical* (RO). ROS yang dihasilkan dalam sel akan didetoksifikasi oleh sistem antioksidan enzimatis dan non enzimatis. ROS jika tidak didetoksifikasi dapat menyebabkan kerusakan-kerusakan pada molekul lipid, protein maupun DNA.

Enzim SOD, CAT dan POX merupakan enzim antioksidan yang mempunyai peran penting dalam meningkatkan resistensi tanaman terhadap stres oksidatif. Enzim SOD mampu mengkonversi radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Walaupun H_2O_2 tidak seaktif superoksida, tetapi masih berupa radikal bebas yang tidak stabil dan berbahaya bagi tanaman karena pengaruh oksidatif dan destruktifnya pada metabolisme tanaman. Dalam organisme, H_2O_2 dan superoksida yang lain akan dikonversi menjadi oksigen dan air oleh CAT dan POX (Onyayar dan Cekik, 2005; Panda dan Khan, 2004)..

Di bawah kondisi stres, aktivitas SOD, CAT dan POX pada tanaman biasanya dianggap sebagai indikator dari toleransi genotip terhadap kondisi stres. Menurut Mulholland *et al.*, (2003), pengaruh stres kekeringan terhadap perubahan enzim antioksidan dikoordinasi oleh peningkatan sejumlah hormon. ABA dapat menyebabkan peningkatan ROS, menginduksi ekspresi gen antioksidan yang mengkode SOD dan CAT dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD, CAT, askorbat POX dan glutathione reduktase (Guan *et al.*, 2000; Jiang dan Zhang, 2002; Guan dan Scandalios, 1998).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya penurunan aktivitas SOD, CAT dan POX pada jaringan hipokotil kecambah kedelai di bawah kondisi stres kekeringan. Peningkatan aktivitas enzim antioksidan hanya terjadi pada aktivitas SOD dan pada jaringan hipokotil dan POX pada jaringan akar. Kecenderungan penurunan aktivitas enzim SOD, CAT dan POX jaringan hipokotil pada penurunan potensial air ini diduga disebabkan karena ketidakmampuannya untuk mendetoksifikasi ROS secara langsung.

Penurunan aktivitas enzim antioksidan di bawah kondisi stres abiotik juga telah dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya, yaitu penurunan aktivitas SOD pada tanaman *Hydrilla verticillata* yang mengalami stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG (Panda dan Khan, 2004), penurunan aktivitas CAT pada tanaman padi yang mengalami stres garam (Sawada *et al.*,), penurunan aktivitas POX pada kecambah tomat yang mengalami stres kekeringan (Onyayar dan Cekik, 2005) dan tanaman padi yang mengalami stres garam. Menurut Chen *et al.*, 1993, 1997), penurunan aktivitas CAT pada tanaman tembakau dan padi di bawah kondisi stres disebabkan oleh adanya akumulasi asam salisilat. Sedangkan hasil penelitian Demiral *et al.*, (2005) pada tanaman barley menunjukkan bahwa penurunan aktivitas POX disebabkan adanya peningkatan akumulasi protein daun.

Berbeda dengan aktivitas enzim SOD, CAT dan POX pada jaringan hipokotil yang mengalami penurunan di bawah kondisi stress kekeringan, aktivitas POX pada jaringan akar di bawah kondisi stres kekeringan justru mengalami peningkatan. Adanya

perbedaan aktivitas enzim POX antara jaringan yang berbeda juga dilaporkan oleh Onyayar dan Cekik (2005) pada tanaman tomat di bawah kondisi stres kekeringan. Kekeringan menginduksi peningkatan aktivitas POX pada jaringan daun muda tetapi menurunkan aktivitas POX pada jaringan daun tua.

Selain dipengaruhi oleh umur atau jenis organ tanaman, aktivitas enzim antioksidan juga dipengaruhi oleh kultivar yang berbeda. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas SOD dan CAT pada jaringan hipokotil dari varietas kedelai yang toleran (Dieng dan Tidar) pada penurunan potensial air $-0,41$ Mpa mengalami penurunan lebih kecil dibandingkan dengan varietas kedelai peka (Tambora dan Burangrang). Di bawah kondisi stres kekeringan, aktivitas POX akar pada varietas kedelai yang toleran meningkat sejalan dengan peningkatan penurunan potensial air. Sedangkan pada varietas peka, peningkatan aktivitas POX hanya terjadi sampai pada penurunan potensial air $-0,19$ Mpa, pada penurunan potensial air $-0,41$ Mpa aktivitas POX mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas SOD dan CAT pada jaringan hipokotil dan aktivitas POX pada jaringan akar di bawah stress kekeringan berkaitan dengan tingkat toleransi varietas kedelai. Peningkatan aktivitas enzim antioksidan ini pada varietas kedelai yang toleran menegaskan adaptasi fisiologi yang lebih baik dari varietas ini di bawah kondisi kekeringan.

Beberapa hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas enzim antioksidan pada tanaman di bawah stress biasanya dianggap sebagai indikator toleransi genotip terhadap kondisi stres. Hasil penelitian Acar *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa aktivitas SOD pada kultivar barley yang resisten terhadap kekeringan lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas SOD dari kultivar barley yang peka. Sedangkan Das *et al.*, (2004) melaporkan bahwa aktivitas enzim CAT dan POX pada kultivar padi yang toleran lebih tinggi dibandingkan dengan kultivar yang peka.

BAB VI KESIMPULAN

0800492

Penurunan potensial air pada fase pertumbuhan vegetatif kedelai mampu meningkatkan akumulasi prolin dan gula total terlarut. Akumulasi prolin dapat digunakan sebagai indikator toleransi kekeringan, sedangkan peningkatan akumulasi gula total terlarut dalam kondisi stres kekeringan tidak berkorelasi dengan tingkat toleransi varietas kedelai terhadap stres kekeringan. Varietas toleran mengalami peningkatan akumulasi prolin lebih tinggi dengan kecenderungan memiliki pola yang teratur, dibandingkan dengan varietas peka.

Penurunan potensial air selama fase pertumbuhan vegetatif kedelai juga menyebabkan perubahan aktivitas enzim SOD dan POX pada jaringan daun dan akar. Perubahan aktifitas SOD dan POX di bawah kondisi stres kekeringan sangat dipengaruhi oleh varietas kedelai yang diuji dan besarnya penurunan potensial air. Perubahan aktivitas SOD dan POX pada jaringan daun di bawah kondisi stres kekeringan berkorelasi dengan tingkat toleransi varietas terhadap stres kekeringan. Penurunan potensial air meningkatkan aktifitas SOD pada jaringan daun dari varietas toleran Dieng dan Tidar tetapi menurunkan aktifitas SOD pada varietas peka. Sebaliknya penurunan potensial air menurunkan aktivitas POX pada jaringan daun dari varietas toleran dan meningkatkan aktivitas POX pada varietas peka. Tidak ada perbedaan yang jelas antara aktifitas SOD dan POX pada jaringan akar antara varietas toleran dan peka.

Perubahan aktifitas SOD, CAT dan POX di bawah kondisi stres kekeringan pada fase perkecambahan juga dipengaruhi oleh varietas kedelai yang diuji dan besarnya penurunan potensial air. Pada potensial $-0,67$ Mps, penurunan aktivitas SOD pada jaringan daun dan aktivitas peroksidase pada jaringan akar dari varietas toleran lebih rendah dibandingkan dengan varietas peka. Sedangkan aktivitas CAT pada jaringan hipokotil dan akar antara varietas toleran dan peka tidak menunjukkan pola yang jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Acar O, Turkan I, Ozdemir F. 2001. Superoxide dismutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Acta Physiologis Plantarum* 23: 351-356.
- Adisarwanto & Wudianto. 1999. Meningkatkan hasil panen kedelai di lahan sawah-kering-pasang surut. PT Penebar Awadaya, Anggota IKAPI. Bogor.
- Adkins SW, Kunanuvatchaidah R, Godwin ID. 1995. Somaclonal variation in rice-drought tolerance and other agronomic characters. *Aust.J.Bot* 43:201-209.
- Al-Bahrany A.M. 2002. Callus Growth and Proline Accumulation in Response to Polyethylene Glycol Induced Osmotic Stress in Rice, *Oryza sativa* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences* V 12 : 1294-1296.
- Alberte RS, Thornber JP, Fiscus EL. 1977. Water stress effects on the content and organization of chlorophyll and bundle sheath chloroplast of maize. *Plant Physiol* 59:351-352.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Peranian, 1997. Kelompok Peneliti Sumber Daya Genetika. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor.
- Bansal KC, Shantha-nagarajan NP, Sukamran, Nagarajan S. 1991. A rapid screening technique for drought resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research* 34:241-248.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.
- Belhassen E. dan P. Monneveux. 1996. The Diversity of Drought Adaptation in the Wide. *Plant Growth Regulation*. 20: 85-92.
- Benedetti, C.E., dan P. Arruda. 2002. Altering the Expression of the Chlorophyllase Gene *ATHCOR1* in Transgenic *Arabidopsis* Caused Changes in the Chlorophyll to Chlorophyllide Ratio. *Plant Physiol*. 128 : 1255-1263.
- Bhatnagar PS, Tiwari SP. 1996. Soybean. Di dalam: Bahn and Salimath (ed). Genetics, Cytogenetics and breeding of crop plant. Vol.1. Pulses and Oilseed. Science publishers. Inc. USA.
- Bouman, B.A.M., dan Toung, T.P. 2001. Field Water Management to save Water and Increase its Productivity in Irrigated Lowland Rice. *Agriculture Water Management*. 49: 11-30.
- BPS. 2001. Harvested Area, Yield rate and production of soybean by Province, 2001. <http://www.bps.go.id/sector/agri/pangan/tables.shtml>

- Budianto FA, Solahuddin S, Baharsjah JS, Rumawas F. 1984. Pengaruh tekanan kekeringan terhadap pertumbuhan dan produksi beberapa varietas kedelai pada grumusol Lombok Tengah. *Buletin Agronomi* 14:17-30.
- Caplan, A dan S. Iyer. 1998. Product of Prolin Catabolism can Induce Osmotically Regulated Gene in Rice. *Plant Physiol.* 116 : 203 -211.
- Carter TE, Rufty TW. 1992. Soybean plant introduction exhibiting drought and aluminium tolerance. Di dalam: Proceeding adaptation of food crops to temperature and water stress. AVRDC. Taipei, 13-18 August 1992. hlm 335-346.
- Chapman SC, Crossa J, Edmeades GO. 1997. Genotype by environment effects and selection for drought tolerance in tropical maize. I. Two pattern analysis of yield. *Euphytica* 95:1-9.
- Chavan AA, Dhoble MV, Khating EA. 1992. Effects of artificial water stress on different genotypes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in dryland. *Indian J Agric Sci* 62:376-381.
- Chen Z, Lyer S, Caplan A, Klessig DF, Fan B. 1997. Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase indifferent rice tissue. *Plant Physiol* 114: 193-201
- Chen Z, Silva H, Klessig DF. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.
- Clifford SC, Stronaach IM, Mohamed AD, Azam-Ali SN, Crout NMJ. 1993. The effects of elevated atmospheric carbon dioxide and water stress on light interception, dry matter production, and yield in stand of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *J Exp Bot* 44:1763-1770
- Close TJ, 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* 97:795-803.
- Dami I, Hughes H. 1995. Leaf anatomy and water loss of in vitro PEG-treated 'Valiant' grape. *Plant Cell Tiss Org Cult* 42:179-184.
- Dami I, Hughe HG. 1997. Effects of PEG-induced water stress on *in vitro* hardening of 'valliant' grape. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47:97-101.
- Darbyshire B. 1974. The Function of The Carbohydrate Units of Three Fungal enzymes in Their resistance to Dehydration. *Plant Physiol.* 54 : 717-721.
- Das KK, Panda D, Nagaraju M, Sharma SG, Sarkar RK. 2004. Antioxidant enzymes and aldehyde releasing capacity of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) as determinants of anaerobic seedling establishment capacity. *Bulh.J.Plant Physiol.* 30(1-2): 34-44.

- Demiral MA, Aydin M, Yorulmaz A. 2005. Effect of salinity on growth chemical composition and antioxidative enzyme activity of to malting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Turk.J.Biol.* 29: 117-123.
- Dhopte AM, Ramteka SD. 1991. Relative changes in root growth and respiration in drought tolerant and susceptible genotypes of peanut under field conditions. *Annals Plant Physiol* 5:213-217.
- Duncan RR, Waskom RM, Nabors MW. 1995. *In vitro* screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) for soil stress tolerance. *Euphytica* 85:371-380.
- El-Sahed H, Kirkwood RC. 1992. Response of adapted and unadapted soybean cell suspension cultures to water stress. *Phyton-Horn* 32:263-275.
- El-Sharkawi HM. 1993. Temperature effects on the germination of some crop plant seeds under two type of stress. Di dalam: Proceeding Adaptation of food crops to temperature and water stress. AVRDC. Taipei, 13-18 August 1992. Hlm 91-99.
- Franca-Neto JB, Krzyzanowski FC, Henning AA, West SH, Miranda LC. 1993. Soybean seed quality as affected by shriveling due to heat and drought stresses during seed filling. *Seed Science and Technology* 21:107-116.
- Gagopadhyay G, Basu S, Gupta S. 1997. *In vitro* selection and physiological characterization of NaCl- and mannitol-adapted callus lines in *Brassica Juncea*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 50:164-169.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.
- Gardner, F. P., R. B. Pearce dan Mitchell. 1991. Fisiologi Tanaman Budidaya Cetakan Pertama. Penerjemah H. Susilo. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Gibon, Y., P. Sulpice dan F. Larher. 2000. Proline Accumulation in Canola Leaf Discs Subjected to Osmotic Stress is Related to the Loss of Chlorophylls and to the Decrease of Mitochondrial Activity. *Physiologia Plantarum*. 110:469-476.
- Grabau EA, Hanlon R, Pesce A. 1995. Mutagenesis and selection for oligomycin resistance in soybean (*Glycine max* L. Merr) suspension culture cells. *Plant Cell Tiss Org Cult* 42:121-127.
- Guan L, Zhao J, Scandalios JG. 2000. Cis-element and trans-factors that regulate expression of maiz Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J.* 22: 87-95.
- Gulati A, Jaiwal PK. 1993. Selection and characterization of mannitol-tolerant callus lines of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant Cell Tiss Org Cult* 34:35-41.

- Hanson AD, Nelsen CE, Pedersen AR, Everson EH. 1979. Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. *Crop Sci* 19:489-493.
- Harnowo D. 1993. Evaluasi paket teknologi produksi benih kedelai untuk lahan kering. Prosid.Sem.Nas.Pengb.Wil. Lahan Kering, 380-389.
- Hunt PG, Matheny TA, Wright FS, Doty CW. 1993. Effects of water table depth on nitrogen accumulation and pod yield of peanut. *J Soil Water Conserv* 48:534-538.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanches-Diaz M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol Plant* 84:55-60.
- Jhana, D.E., B.L.D. Chowdury, M.A.Haque, M.R.H. Bhulyan dan M.M. Husain. 2001. Biochemical Screening of Some Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes for Drought Tolerance. *Biological Sciences* 1(11): 1009-1011.
- Jiang M and Zhang J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increases generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzyme in maize leaves. *Journal of experimental Botany* 53(379): 2401-2410.
- Johnson J. W. dan B. Huang. 1995. Root Respiration and Carbohydrate Status of Two Wheat Genotypes in Response to Hypoxia. *Annals of Botany*, 75: 427-432.
- Kim YH, Janick J. 1991. Abscisic acid and proline improve desiccation tolerance and increase fatty acid content of cerealy somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 24:83-89.
- Laohasiriwong S. 1986. Yield response of selected soybean cultivars to water stress during different reproductive growth periods. Soybean in tropical and subtropical cropping systems. Proceedings of a symposium tsukuba, Japan, 26 september – 1 october 1983.
- Madan S, Nainawatee HS, Jain RK, Chowdhury JB. 1995. Proline and proline metabolising enzymes in vitro selected NaCl-tolerant Brassica juncea L. under salt stress. *Annals of Botany* 76:51-57.
- Maralappanavar MS, Kuruvinashetti MS, Harti CC. 2000. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in Sorghum bicolor (L.) Moench. *Euphytica* 115: 173-180.
- Masyhudi MF, Patterson RP. 1990. The effects of water stress on nitrogen absorption of soybean. *Indonesian Journal of Crop Science* 62:43-63.
- Mexal J, Fisher JT, Osteryoung J, Patrick Reid CP. 1975. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relation. *Plant Physiol* 55:20-24.

- Michel BE, Kaufmann MR. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol* 57:914-916.
- Mulholland BJ, Taylor IB, Jackson AC, Thompson AJ. 2003. Can ABA mediate responses of salinity stressed tomato. *Environmental and Experimental Botany* 50: 17-28.
- Mundree, S. G., B. Baker, S. Mowla, S. Peters, S. Marais, C. V., Willigen, K. Govender, A. Maredza, S. Muyanga, J.M., Farrant and J. A. Thomson, 2002. Physiological and Molecular Insights into Drought Tolerance. *African Journal of Biotechnology* 1 : 28-38.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for medium rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nabors MW, Dykes TA. 1985. Tissue culture of cereal cultivar with increased salt, drought, and acid tolerance. *Biotechnology in International Agricultural Research*. Di dalam: Proceedings of the Inter-center seminar on International Agricultural Research Center and Biotechnology 23-27 April 1984.
- Nambara E, Kawaide H, Kamiya Y, Naito S. 1998. Characterization of *Arabidopsis thaliana* mutant has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acid during dehydration. *Plant Cell Physiol* 39:853-858.
- Newton, J.R., H.S. Roberta dan S. Bhaskaran. 1985. Physiological Changes in Cultured Sorghum Cells in response to Induced Water Stress. I. Free Prolin. *Plant Physiol* .79: 266-269.
- Newton, J.R., H.S. Roberta, S. Bhaskaran dan J. D. Puryear. 1986. Physiological Changes in Cultured Sorghum Cells in response to Induced Water Stress. II. Soluble Carbohydrate and Organic Acids. *Plant Physiol*. 81 : 626-629.
- Newton RJ, Puryear JD, Sen S. 1989. Water status and growth of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) Callus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 16:3-13.
- Olsson M, Nilson K, Liljenberg C, Hendry GAF. 1996. Drought stress in seedling: lipid metabolism and lipid peroxidation during recovery from drought in *Lotus corniculatus* and *Cerastium fontanum*. *Physiologia plantarum* 96: 577-584.
- Ober ES, Sharp RE. 1994. Proline accumulation in maaize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. *Plant Physiol* 105:981-987.
- Onyayar S, Cekik FO. 2005. Changes in antioxidative enzymes of young and mature leaves of tomato seedlings under drought stress. *Turk J.Biol* 29: 211-216.
- Panda SK and Khan MH. 2004. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. *Braz.J.Plant Physiol*. 16(2):115-118.

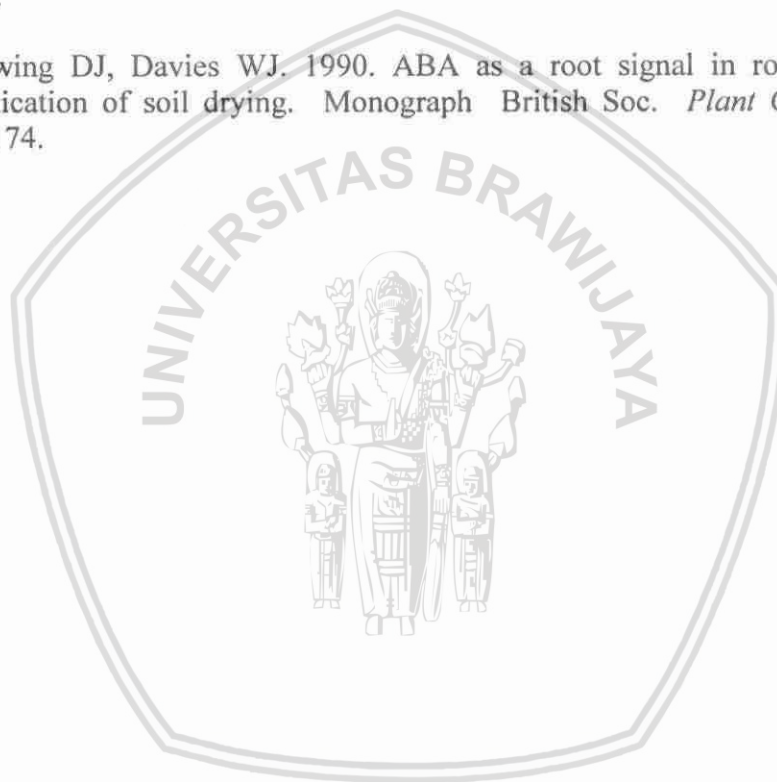
- Pasaribu D, Sunarlim N. 1988. Tekanan kekeringan pada kedelai. Seminar hasil penelitian tanaman pangan Ballitan. Nadan Penelitian & Pengembangan Pertanian. Balai Penelitian Tanaman Bogor.
- Patel MS, Golakiya BA. 1993. Water stress and aging effects on biophysical parameters of field crops. *Indian J of Agricultural Research*, 27 (92):110-114.
- Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D. 1997. Differential accumulation of water stress related proteins, sucrose synthase and soluble sugar in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiol Plantarum* 99:153-159.
- Perez-Molphe-Balch E, Gidekel M, Segura-Nieto M, Herrera-Estrella L, Ochoa-Alejo N. 1996. Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa*) with different levels of drought tolerance. *Physiol Plant* 96: 284-290.
- Piqueras A, Hernandez JA, Olmos E, Hellin E, Sevilla F. 1996. Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 53-60.
- Pookpadi A, Thiravirojana K, Saeradee I, Chaikaew S. 1990. Response of new soybean accessions to water stress during reproductives phase. *Kasetsart J Nat Sci* 24: 378-387.
- Popova LP, Tsoney TD, Lazova GN, Stoinova. 1996. Drought – and ABA-induced changes in photosynthesis of barley plants. *Physiologia plantarum* 96: 623-629.
- Prasad PVD, Potluri SDF. 1996. Influence of proline and hydroxyproline on salt-stresses axillary bud cultures of two varieties of potato (*Solanum tuberosum*). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32:47-50.
- Pruvot G, Massimino J, Peltier G, Rey P. 1996. Effeacts of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*. *Physiol Plantarum* 97:123-131.
- Quintero JM, Fournier FM, Ramos J, Benloch M. 1998. K⁺ status and ABA affect both exudation rate and hydraulic conductivity in sunflower roots. *Physiol Plantarum* 102:279-284.
- Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81:93-107.
- Rajashekar G, Palquist D, Ledbetter CA. 1995. In vitro screening procedure for osmotic tolerance in *Prunus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 41:159-164.
- Rao RCN, Williams JH, Wadia KDR, Hubick KT, Farquhar GD. 1993. Crop growth, water use efficiency, and carbon isotope discrimination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes under end of season drought conditions. *Annals Appl Biol* 122: 357-367.

- Raper CD, Kramer PJ. 1987. Stress Physiology. Didalam: Wilcox, J.R. (ed.) Soybeans: Improvement, production and uses. Second edition. New York: American Society of Agronomy, Inc. Hlm 589-625.
- Reddy CR, Reddy SR. 1993. Scheduling irrigation for peanuts with variable amounts of available water. *Agric Water Manag* 23:1-9.
- Roberts, SK. 1998. Regulation of K⁺ channel in maize roots by water stress and abscisic acid. *Plant Physiol* 116:145-153.
- Rosario DAD, Ocampo EM, Sumague AC, Paje MCM. 1993. Adaptation of vegetable legumes to drought stress. Di dalam: Proceeding Adaptation of food crops to temperature and water stress. AVRDC. Taipei, 13-18 August 1992. Hlm 360-371.
- Sakarvadia, HL and BS Yadav. 1994. Effects of water stress at different growth phases of groundnut on yield and nutrient absorption. *J Indian Soc Soil Sci* 42:147-149.
- Salisbury F.B. dan C.W. Ross. 1995. Fisiologi Tumbuhan. Diterjemahkan oleh Lukman, D.R. dan Sumaryono. Penerbit ITB, Bandung.
- Santos-Diaz MS, Ocha-Alejo N. 1994. PEG-tolerant cell clones of chili pepper: growth, osmotic potentials and solute accumulation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 37:1-8.
- Sarkar RK. 1993. Effect of water stress on proline accumulation and its association with certain biochemical characters in soybean. *Indian Journal of Plant Physiology* 36: 184-186
- Sawada H, Kim DW, Kobayashi K. And Shim IS. Inabentide-induced alleviation of salt stress in rice as linked to changes in salicylic acid content and catalase. *J.Crop Sci.* 10: 41-46
- Schurr U, Gollan T. 1990. Composition of xylem sap of plants experiencing root water stress- a descriptive study. Monograph British Soc. *Plant Growth Reg* 21:201-214.
- Schurr U, Gollan T, Schulza ED. 1992. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus* II: Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant Cell and Environ* 15:561-567.
- Sharp, RE. 1994. Comparative sensitivity of root and shoot growth and physiology to low water potentials. Monograph British Soc. *Plant Growth Reg* 21:13-27.
- Shimada S, Kokobun M, Shibata H, Matsui S. 1992. Effect of water supply and defoliation on photosynthesis, transpiration and yield of soybean. *Japanese Journal of Crop Science* 61: 264-270.

- Sims, D.A. dan J.A. Gamon. 2000. Estimating Antocyanin, Chlorophyll, and Carotenoid Concentration Using Hyperspectral Reflectance. California State University. Los Angeles. USA.
- Sloane RJ, Patterson RP, Carter TE. 1990. Field drought tolerance of a soybean plant introduction. *Crop Sci* 30:118-123.
- Smith KJ, Huyser W. 1987. World distribution and significance of soybean. In: Wilcox (ed.). Soybean: Improvement. In: D.W. Buxton (ed.). Proc. 1st Int'I Crop. Sci. Congress, July 1992, Ames, IA. Crop. Sci. Soc. America, Madison, WI pp 629-632.
- Sneller CH, Dombek D. 1997. Use of irrigation in selection for soybean yield potential under drought. *Crop Sci* 37:1141-1147.
- Song HS, Lim SM, Widholm JM. 1994. Selection and regeneration of soybeans resistant to pathotoxic culture filtrates of *Septoria glycines*. *Phytopathology* 84:948-951.
- Sopandie D, Hamim, Jusuf M, Heryani N. 1996. Toleransi tanaman kedelai terhadap cekaman air: akumulasi prolin dan asam absisik dan hubungannya dengan potensial osmotik daun dan penyesuaian osmotik. *Buletin Agronomi* 24:6-9.
- Specht JE, Graef GL. 1996. Limitations and potentials of genetic manipulation of soybean. In: Verma, D.P.S. & R.C. Shomaker (ed.) Soybean: Genetic, Molecular Biology and Biotechnology. CAP International, Wallingford.
- Subramanian VB, Reddy GJ, Maheswari M. 1993. Photosynthesis and plant water status of irrigated and dryland cultivar of groundnut. *Indian J Plant Physiol* 36:236-238.
- Sudarsono, Widoretno W. 2003. Pengaruh cekaman kekeringan pada fase pertumbuhan generatif terhadap pertumbuhan dan hasil kedelai yang berbeda toleransinya terhadap stres. *Jurnal Penelitian Pertanian* 22 (2): 109-119.
- Suhartina. 1003. Perkembangan dan Deskripsi varietas Unggul Kedelai 1918-2002. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat penelitian dan Pengembangan Tanaman pangan. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Malang.
- Sumaryati S, Negrutiu I, Jacobs M. 1992. Characterization and regeneration of salt-and water-stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Theor App Genet* 83:613-619.
- Sunarpi. 2003. Akumulasi Beberapa Metabolit di Sistem Perakaran Tanaman Kedelai yang Diberikan Nitrogen dan Sulfur pada Kondisi Defisit Air. *Jurnal Biologi Tropis*. 4 : 58-63.
- Thomas H, Dalton SJ, Evans C, Chorlton KH, Thomas ID. 1996. Evaluating drought drought resistance in germplasm of meadow fescue. *Euphytica* 92:401-411.

- Tuchin SV, D'Yachuk PA. 1994. Obtaining drought-resistant forms of wheat by single-step selection in callus cultures. *Sel'skokhzyaistvennaya-Biologiya* 5:21-23.
- Van Doren, Jr. DM, Reicosky DC. 1987. Tillage and Irrigation. In: Wilcox (ed.). Soybean: Improvement, production and uses. Second edition. American Society of Agronomy, Inc, USA.
- Venkateswarlu B, Mukhopadhyay K, Ramesh K. 1993. Effects of PEG induced osmoticum concentration on the induction of desiccation tolerance in microspore derived embryos of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). *Breeding Sci* 44: 29-34.
- Verslues PE, Ober ES, Sharp RE. 1998. Root growth and oxygen relation at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solution. *Plant Physiol* 116:1403-1412.
- Vieira RD, Tekrony DM, Eglia DB. 1992. Effect of drought and defoliation stress in the field on soybean seed germination and vigor. *Crop Sci* 32:471-475.
- Weisz PR, Denison RF, Sinclair TR. 1985. Response to drought stress of nitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybeans. *Plant Physiol* 78: 525-530.
- Whitsitt MS, Collin RG, Mullet JE. 1997. Modulation of dehydration tolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol* 114:917-925.
- Widoretno W, Arumningtyas EL, Sudarsono. 2002a. Pengembangan metode seleksi *in vitro* dalam membantu pemuliaan kedelai untuk toleransi terhadap cekaman (stress) kekeringan. Kementerian Riset dan Teknologi RI. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Widoretno W, Guhardja E, Ilyas S, Sudarsono 2002b. Efektivitas polietilena glikol untuk mengevaluasi tanggapan genotipe kedelai terhadap cekaman kekeringan pada fase perkecambahan. *Hayati* 9 (2): 33-36.
- Widoretno W, Arumningtyas EL, Sudarsono. 2003a. Metode induksi pembentukan embrio somatik dari kotiledon dan regenerasi plantlet kedelai secara *in vitro*. *Hayati* 10 (1): 19-24.
- Widoretno W, Harran S, Sudarsono. 2003b. Keragaman karakter kualitatif dan kuantitatif pada populasi tanaman somaklon kedelai dari embrio somatik hasil seleksi *in vitro*. *Hayati* 10 (3): 110-117.
- Widoretno W, Megia R, Sudarsono. 2003c. Reaksi embrio somatik kedelai dan penggunaannya untuk seleksi *in vitro* terhadap cekaman kekeringan. *Hayati* 10 (4): 134-139.
- Widoretno, W. dan Sudarsono. 2004. Evaluasi Sejumlah Galur Kedelai Varian Somaklonal Hasil Seleksi *In Vitro* terhadap Stress Kekeringan. *Hayati* (11) 1 : 11-20.

- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene involved in responsiveness to drought, low temperature, or high salt stresses. *The Plant Cell* 6:251-264.
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol* 38:1095-1102.
- Zapata JM, Calderon AA, Ros Barcelo A. 1995. Peroxidase isoenzyme patterns in cell cultures derived from cotyledon, stem, leaf and fruit from grapevine (*Vitis vinifera* cv. Monastrell). *Annals of Botany* 75: 443-448.
- Zhang J, Kirkham MB. 1994. drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.* 35 (5): 785-791.
- Zhang JH, Gowing DJ, Davies WJ. 1990. ABA as a root signal in root to shoot communication of soil drying. Monograph British Soc. *Plant Growth Reg* 21:163-174.



LAMPIRAN

Lampiran 1.

Tabel 1. Rata-rata persentase perkecambahan dan panjang hipokotil kecambah di bawah kondisi stres kekeringan.

Varietas	Persentase Perkecambahan (%)				Panjang Hipokotil (cm)			
	0	-0.03	-0.19	-0.41	0	-0.03	-0.19	-0.41
Dieng	90 a	100 a	87 a	64 b	11.8 a	5.7 b	5.2 b	1.4 c
Tidar	97 a	90 a	83 ab	56 b	10.6 a	8.40 a	3.0 b	0.9 b
MLG2805	100 a	97 a	98 a	72 b	11.8 a	8.0 b	4.8 c	1.1 d
Tambora	100 a	70 b	43 c	18 d	9.3 a	7.6 a	2.3 b	0.6 b
Burangrang	100 a	100 a	68 b	30 c	7.9 a	5.7 a	1.5 b	0.7 b
MSC8606	100 a	87 ab	70 bc	42 c	13.8 a	6.7 b	2.4 c	1.2 c



Lampiran 2.

BIODATA PENELITI - UTAMA

Nama : Dr. Wahyu Widoretno, M.Si.
 Tempat/tgl lahir : Nganjuk, 14 April 1963

Pendidikan

Tempat Pendidikan	Kota/Negara	Tahun Lulus	Bidang Studi
Universitas Gadjah Mada (UGM)	Yogyakarta, Indonesia	1987	Fisiologi Tumbuhan/ Kultur Jaringan Tumbuhan
Universitas Gadjah Mada	Yogyakarta, Indonesia	1995	Fisiologi Tumbuhan/Kultur Jaringan Tumbuhan
Institut Pertanian Bogor	Bogor, Indonesia	2003	Fisiologi Tumbuhan /Kultur Jaringan Tumbuhan

Pengalaman Riset:

No	Judul Riset	Tahun
1.	Isolasi dan fusi protoplas kedelai dan padi dan pemeliharaan hasil fusi	1995
2.	Seleksi kedelai untuk ketahanan kekeringan dengan teknik <i>in vitro</i> . Proyek ARM, Deptan, Republik Indonesia	1996
3.	Perbanyak vegetatif tanaman durian unggul dan tanaman dawa dengan teknik <i>in vitro</i>	1997
4.	Pengembangan metode seleksi <i>in vitro</i> dalam membantu pemuliaan kedelai untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan. Proyek RUT, Kementrian Riset dan Teknologi RI. LIPI.	2000-2002
5.	Seleksi <i>in vitro</i> untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan pada kedelai dan karakterisasi varian somaklonal yang toleran	2003

Publikasi yang relevan:

Widoretno W, Sudarsono. 2004. Evaluasi sejumlah galur kedelai varian somaklonal hasil seleksi *in vitro* terhadap stress kekeringan. *Hayati*: 11 (1): 11-20.

Sudarsono, Widoretno W. 2004. Pengaruh cekaman kekeringan pada fase pertumbuhan generatif terhadap pertumbuhan dan hasil kedelai yang berbeda toleransinya terhadap stres. *Jurnal Penelitian Pertanian* 22 (4): 109-119.

Widoretno W, Megia R, Sudarsono. 2003. Reaksi embrio somatik kedelai dan penggunaannya untuk seleksi *in vitro* terhadap cekaman kekeringan. *Hayati* 10 (4): 134-139.

Widoretno W, Harran S, Sudarsono. 2003. Keragaman karakter kualitatif dan kuantitatif pada populasi tanaman somaklon kedelai dari embrio somatik hasil seleksi *in vitro*. *Hayati* 10 (3): 110-117.

Widoretno W, Arumningtyas EL, Sudarsono. 2003. Metode induksi pembentukan embrio somatik dari kotiledon dan regenerasi plantlet kedelai secara *in vitro*. *Hayati* 10 (1): 19-24.

Widoretno W, Guhardja E, Ilyas S, Sudarsono 2002. Efektivitas polietilena glikol untuk mengevaluasi tanggapan genotipe kedelai terhadap cekaman kekeringan pada fase perkecambahan. *Hayati* 9 (2): 33-36.

Arumningtyas EL, Harjati N, **Widoretno W**. 1998. Perbanyakkan durian unggul dari Binangun, Blitar, secara *in vitro*. *Jurnal universitas Brawijaya*.

Widoretno W, Purbaningsih S, Suryowinoto M. 1996. Fusi dan kultur protoplas kedelai dan padi. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* I: 22-32.

BIODATA PENELITI – II

Nama : Ir. Retno Mastuti, MagSc., DAgSc.
Tempat/tgl lahir : Ambon, 9 Mei 1965

Pendidikan

Tempat Pendidikan	Kota/Negara	Tahun Lulus	Bidang Studi
Institut Pertanian Bogor (IPB)	Bogor, Indonesia	1989	Kultur Jaringan Tumbuhan
Universitas Nagoya	Nagoya, Jepang	1995	Kultur jaringan Tumbuhan
Universitas Nagoya	Nagoya, Jepang	1998	Kultur jaringan Tumbuhan

Pengalaman Riset:

No	Judul Riset	Tahun
1	Kajian ultrastructural hasil fusi antara species C3 dan C4 dari famili Amaranthaceae	(1995-1998)
2	Transfer gena <i>codA</i> ke tanaman tebu untuk toleransi stres kekeringan	(1999-2000)
3	Isolasi dan kultur protoplas daun planlet <i>Curcuma heyneana</i>	(2000-2001)
4	Mikropropagasi <i>Tectona grandis</i>	2002
5	Mikropropagasi <i>Macadamia integrifolia</i>	2002
6	Mikropropagasi <i>Morinda citrifolia</i>	2003

Publikasi yang relevan:

- Mastuti, R.**, H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. Culture of *Celosia cristata* cell suspension protoplasts. *J. Berkala Hayati* (in press)
- Mastuti, R.**, A. Munawarti, W.B. Widyasari and E. Sugiyarta. 2002. Enzymatically Isolation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Protoplasts. *J. Ilmu-ilmu Hayati (Life Sciences)* 14:211-219
- Supriyadi dan **R. Mastuti**. 2000. Using transmission electron microscope (TEM) for observation of plant cell ultrastructure. *Fusii* 6:13-16

4. **Mastuti, R.**, H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. 1998. Ultrastructure of hybrid callus between C3 and C4 species of Amaranthaceae. *Plant Prod. Sci.* 1(2):136-144
5. **Mastuti, R.**, H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. 1998. Ultrastructure of fusion product between protoplasts from C3 and C4 species of Amaranthaceae. *Plant Prod. Sci.* 1(1):67-74
6. **Mastuti, R.**, H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. 1997. Production of Intergeneric Hybrid Calli from C3 and C4 species of Amaranthaceae through protoplast fusion. *Jpn. J. Crop Sci.* 66:456-465.

BIODATA PENELITI - III

Nama Lengkap dan Gelar : Dra. Serafinah Indriyani, MSi
Tempat/tanggal lahir : Surabaya, 9 September 1963

Pendidikan

UNIVERSITAS/INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG STUDI
Univ. Airlangga/Surabaya	Dra	1987	Biologi
Institut Teknologi Bandung/Bandung	MSi	1993	Biologi Perkembangan Tumbuhan

Daftar penelitian yang relevan dengan proposal penelitian yang dilakukan

NO	JUDUL	TAHUN
1	Morfologi perkembangan buah dan bunga pada kakao / ketua	1993
2	Pengaruh kombinasi hormon GA3, IAA dan Kinetin terhadap internodus kapri / ketua	1994
3	Profil pita protein beberapa varietas kacang hijau / ketua	1996
4	Isolasi dan identifikasi senyawa bioaktif benalu / anggota	1999
5	Kajian anatomi varietas kedelai tahan kering / ketua	2000
6	Konstruksi varietas unggul kenaf melalui teknik RFLP / anggota	2003

Daftar publikasi yang relevan dengan proposal penelitian yang diajukan

- Indriyani, S. & Arumingtyas, E.L. 1997. Variasi isoenzim pada biji kacang hijau. *Natural* 1 (1): 1-7.
- Kirana, C., S.B. Sumitro, M.A. Widodo, R. Mastuti, S. Indriyani, N. Sigittianawati, N.P.E. Widhiyanti dan B. Alfi. 2001. Komposisi senyawa bioaktif benalu. *Jurnal Ilmu-ilmu Teknik (Engineering)*. Lembaga Penelitian UNIBRAW vol. 13 no. 2. Oktober.
- Arumingtyas, E.L. & S. Indriyani. 2001. Pengaruh kolkisin terhadap morfologi dan hasil kedelai. *Natural* vol. 5 no. 1. Februari.
- Indriyani, S. 2002. Studi perkembangan struktur reproduksi pada kakao. *Natural* 6 (2): 8-15.

DRAF ARTIKEL ILMIAH**Pengaruh stres kekeringan pada fase vegetatif terhadap kandungan prolin, gula total terlarut pada beberapa genotip kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.)**

Wahyu Widoretno, Linda winarsih
Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) mengetahui pengaruh cekaman kekeringan yang disimulasi polietilena glikol (PEG) pada pertumbuhan vegetatif, kandungan prolin dan gula total terlarut beberapa genotipe kedelai, (2) mengetahui tingkat toleransi kekeringan beberapa genotipe kedelai berdasarkan respon pertumbuhan vegetatif pada kondisi kekeringan, (3) menentukan indikator fisiologis untuk toleransi kekeringan pada kedelai. Evaluasi pengaruh cekaman kekeringan dilakukan dengan menambahkan PEG pada media tanam selama 2 minggu dengan konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20%, yang setara dengan -0,03, -0,19, -0,41 dan -0,67 MPa. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok faktorial dengan dua faktor, yaitu genotipe kedelai dan konsentrasi PEG. Evaluasi karakter fisiologis dilakukan dengan analisis prolin dan gula total terlarut pada daun kedelai dari genotipe toleran, medium dan peka cekaman kekeringan. Cekaman kekeringan dapat menghambat pertumbuhan tinggi tanaman, jumlah daun, luas daun, panjang internodus, dan menurunkan biomassa akar dan tajuk. Semakin besar dan lama cekaman kekeringan, semakin tinggi penghambatan pada pertumbuhan vegetatif. Besarnya penghambatan pertumbuhan vegetatif bervariasi diantara genotipe kedelai yang diujikan. Penurunan potensial air mampu meningkatkan akumulasi prolin dan gula total terlarut pada daun 5 genotipe kedelai yang diuji dengan peningkatan yang bervariasi. Akumulasi prolin dapat digunakan sebagai indikator toleransi kekeringan. Varietas toleran mengalami peningkatan akumulasi prolin lebih tinggi dengan pola yang teratur, dibandingkan dengan varietas peka. Sedangkan akumulasi gula total terlarut tidak dapat digunakan sebagai indikator tingkat toleransi kekeringan, karena akumulasinya pada varietas toleran dan peka tidak menunjukkan perbedaan.

Kata kunci : gula total terlarut, kedelai, polietilena glikol (PEG), prolin

The Effects of Drought Stress at Vegetative Phase on Growth, Proline and Soluble Total Sugar Content of Some Genotype Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)

Wahyu Widoretno and Linda winarsih
Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRACT

The objectives of this experiment were (1) to evaluate the influence of drought stress simulated by PEG on vegetative growth, content of proline and soluble total sugar of soybean genotypes, (2) to determine the physiological indicator for drought tolerance on soybean. The effect of drought stress were evaluated by addition of 5%, 10%, 15% and 20% PEG on medium which equivalent -0,03, -0,19, -0,41 and -0,67 MPa. The experiment were carried out in a factorial randomized complete block design (RCBD) with 2 factors namely, soybean genotypes and PEG concentration with LSD continuous test ($\alpha 0.05$). The physiological characters were evaluated by analyzing proline and soluble total sugar on soybean's leave of tolerant, medium and sensitive genotypes to drought stress. Drought stress in media inhibited vegetative growth of soybean. The inhibition of vegetative growth increased with increasing of drought stress. The inhibition level of vegetative growth was varying among soybean genotypes. Drought stress on soybean increased proline and soluble total sugar. The higher drought stress, the higher accumulation of proline and soluble total sugar. Increasing the content of proline and soluble total sugar were varying among tested soybean genotypes. Accumulation of proline could be used as an indicator for drought stress tolerance of soybean. The accumulation of proline on tolerant genotypes was higher than sensitive ones and had regular pattern. While the accumulation of soluble total sugar of soybean under drought stress condition could not be used as an indicator for drought stress tolerance of soybean.

Keyword : polyethylena glycol (PEG), proline, soluble total sugar, soybean

Latar Belakang

Kebutuhan konsumsi kedelai di Indonesia semakin meningkat mencapai 2,24 juta ton setiap tahunnya, tetapi kapasitas produksi nasional hanya mampu menghasilkan 1,19 juta ton pada tahun 2000. Akibatnya untuk memenuhi kebutuhan tersebut pemerintah harus mengimpor kedelai sebanyak 1,16 juta ton per tahun (Suharjawanasuria, 2001). Berdasarkan Biro Pusat Data Statistik Deptan (2001), produksi kedelai di Indonesia mengalami penurunan, yaitu dari 18.699.713 ton pada tahun 1992 menjadi 1.259.152 ton pada tahun 2004.

Menurunnya produksi kedelai di Indonesia disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah cekaman kekeringan, rendahnya penggunaan benih bermutu oleh petani dan masalah pengendalian hama sampai saat ini masih belum baik (Suharjawanasuria, 2001). Menurut Sunarpi (2003), pada tanaman legum keterbatasan air tanah adalah faktor pembatas pertumbuhan yang cukup menekan produksi tanaman pertanian hingga 40%-60%. Cekaman kekeringan pada fase vegetatif mengakibatkan penurunan luas daun, hasil panen dan berat kering tajuk (Kisman, 2003) dan mampu menurunkan hasil panen sampai 50 % (Sugito, 1999).

Cekaman kekeringan pada tanaman menyebabkan perubahan pertumbuhan dan fisiologi tanaman. Respon pertumbuhan meliputi: daun klorosis dan nekrosis, pertumbuhan lambat, penurunan biomassa akar, batang, daun dan produksi biji (Pantalone dkk.,1997), penurunan kecepatan perluasan sel dan penurunan luas area daun (Pattanagul dan Madore, 1999). Perubahan fisiologis sering dianggap sebagai bentuk adaptasi tanaman dalam menghadapi cekaman kekeringan agar bisa bertahan hidup. Perubahan tersebut diantaranya adalah, peningkatan kandungan gula dan prolin. Peningkatan kandungan gula terjadi karena adanya cekaman kekeringan, yang mengakibatkan karbohidrat tidak mudah ditranslokasikan ke titik-titik tumbuh untuk membentuk tunas, daun maupun batang sehingga karbohidrat dihidrolisis menjadi gula agar mudah ditranslokasikan ke titik-titik tumbuh tanaman tersebut (Salisbury dan Ross, 1995).

Kondisi kekurangan air pada tanaman menyebabkan konsentrasi asam amino prolin meningkat lebih banyak. Peningkatan prolin pada saat cekaman kekeringan berperan membantu meningkatkan toleransi tanaman terhadap kekeringan dengan bertindak sebagai cadangan nitrogen atau sebagai molekul zat terlarut yang mengurangi potensial air sitoplasma (Gardner dkk., 1991).

Menurut Rodriguez (1997), perbedaan peningkatan kandungan prolin dan gula bisa digunakan sebagai indikator fisiologis untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan pada barley. Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk mengevaluasi tingkat toleransi terhadap cekaman kekeringan dari beberapa genotipe kedelai serta untuk mengetahui apakah respon pertumbuhan serta akumulasi gula dan prolin dapat dijadikan sebagai indikator fisiologis untuk toleransi kekeringan pada kedelai.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh cekaman kekeringan pada pertumbuhan vegetatif, kandungan prolin dan gula total terlarut beberapa genotipe kedelai serta mengetahui respon fisiologis yang dapat digunakan sebagai indikator toleransi kekeringan.

Metode penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai bulan Desember 2005 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Kultur Jaringan dan Mikroteknik (FKM) dan di rumah kaca, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan 5 genotipe, yaitu Dieng dan MLG 2805 (toleran) Galunggung, Petek dan Tambora (peka). Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan dua faktor dan ulangan sebagai kelompok. Faktor pertama adalah genotipe kedelai terdiri dari 13 genotipe. Faktor kedua adalah konsentrasi PEG(6000) yang terdiri atas 0%, 5%, 10%, 15% dan 20%. Perlakuan diulang sebanyak 3X.

Penanaman benih kedelai dilakukan pada media campuran pasir dan arang sekam (1:1). Media tersebut berguna untuk mempermudah penyerapan air dan penembusan akar. Setiap genotipe dilakukan penanaman sebanyak 30 benih untuk 6 polibag (@ polibag ditanami 6 benih). Sebelum diberi perlakuan, dari setiap polibag dipilih 3 tanaman yang seragam. Tanaman kedelai ini dipelihara di rumah kaca. Penyiraman air dilakukan setiap hari dengan kapasitas air jenuh dan dihentikan setelah tanaman berumur 3 minggu.

Kondisi cekaman kekeringan disimulasi dengan menggunakan PEG dengan konsentrasi 5%, 10 %, 15 % dan 20 % yang setara dengan potensial air -0,03, -0,19, -0,41, -0,67 MPa (Mexal dkk., 1975). Perlakuan cekaman kekeringan dilakukan dengan menyiramkan larutan PEG pada media tanam dari tanaman kedelai yang berumur 3 minggu. Penyiraman PEG dilakukan setiap hari dengan volume 75 ml selama 2 minggu.

Evaluasi respon pertumbuhan vegetatif terhadap cekaman kekeringan dilakukan setelah 1 dan 2 minggu perlakuan, sedangkan evaluasi respon fisiologis dilakukan 2 minggu setelah perlakuan. Respon pertumbuhan vegetatif yang diamati meliputi: tinggi tanaman, panjang internodus, jumlah daun trifoliolate, luas daun, berat basah akar dan tajuk, serta berat kering akar dan tajuk. Pengukuran dan penghitungan tinggi tanaman, jumlah daun trifoliolate, panjang internodus dan luas daun dilakukan 1 minggu dan 2 minggu setelah perlakuan. Sedangkan untuk berat basah akar dan tajuk serta berat kering akar dan tajuk dilakukan pada akhir pengamatan, yaitu akhir minggu ke lima.

Tinggi tanaman diukur mulai dari permukaan tanah sampai ujung tanaman. Jumlah daun trifoliolate dihitung dari daun trifoliolate yang pertama tumbuh sampai daun trifoliolate ke dua dari pucuk yang sudah membuka sempurna. Luas daun diukur dengan menggunakan leaf area meter. Daun yang diukur adalah daun trifoliolate ke dua dari pucuk yang sudah membuka sempurna. Berat basah untuk tajuk langsung ditimbang setelah dipanen, sedangkan untuk akar dicuci untuk menghilangkan tanah yang melekat dan dikeringkan dengan tisu kemudian ditimbang. Sedangkan berat kering tajuk dan akar masing-masing dioven pada suhu 80°C selama 2 hari.

Evaluasi respon fisiologis terhadap cekaman kekeringan dilakukan dengan menganalisis kandungan prolin dan gula total terlarut pada daun trifoliolate kedua dari pucuk tanaman dalam kondisi cekaman dan non cekaman dari genotipe yang toleran, medium dan peka terhadap cekaman kekeringan.

Analisis Kandungan Prolin

Analisis kandungan prolin dilakukan berdasarkan metode Bates dkk., (1973). Daun trifoliolate kedua dari pucuk yang sudah membuka sempurna ditimbang seberat $\pm 0,1$ gram, digerus dan dihomogenasikan dengan 5 ml asam sulfosalisilat (3%). Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit, dan supernatan yang didapat dipisahkan. Dua ml supernatan yang didapat direaksikan dengan 2 ml larutan asam asetat glasial dan 2 ml larutan asam ninhidrin (Lampiran 1) dalam tabung reaksi. Kemudian selama 60 menit dipanaskan pada penangas api dengan suhu 100 °C. Reaksi diakhiri dengan menginkubasikan larutan dalam es selama ± 5 menit. Selanjutnya hasil reaksi diekstraksi dengan 4 ml toluene dan di vortex selama 1 menit sehingga terbentuk kromofom. Kromofom yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Untuk standart digunakan DL-proline yang dilarutkan dalam asam sulfosalisilat (3%). Selanjutnya dibuat kurva standar prolin.

Analisis Kandungan Gula Total Terlarut

Kadar gula total dianalisis berdasarkan metode Irigoyen dkk., (1992). Daun trifoliolate kedua dari pucuk yang sudah membuka sempurna ditimbang seberat $\pm 0,1$ gram, digerus dan ditambah 25 ml alkohol 80% panas. Campuran disentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 5000 rpm, supernatant yang didapat diambil dan dimasukkan dalam beaker glass, kemudian ditempatkan pada water bath suhu 100°C sampai alkohol hilang (menguap). Kemudian volume supernatan ditera sampai mencapai volume 100 ml. Selanjutnya diambil 1 ml supernatan, ditaruh dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 1 ml H_2O dan 5 ml reagen anthrone. Reaksi diakhiri dengan menginkubasikan larutan dalam es selama ± 5 menit. Selanjutnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm ditentukan kandungan gula total terlarutnya. Sebagai standart digunakan 1 ml larutan gula yang direaksikan dengan 5 ml reagen anthrone, selanjutnya dibuat kurva standar glukosa.

Analisis Data

Data dianalisis dengan ANOVA dengan uji lanjutan menggunakan BNT pada selang kepercayaan 95 %.

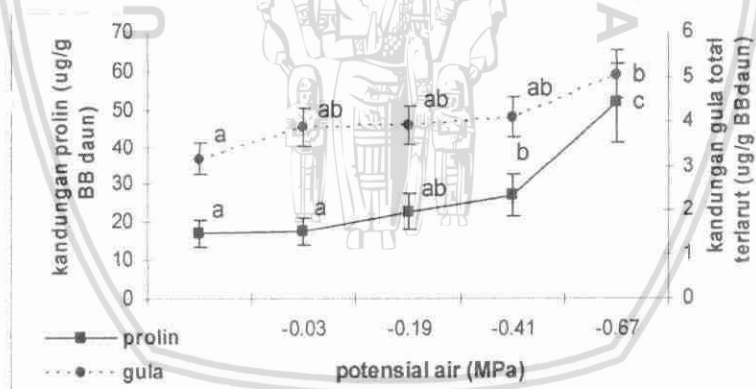
Hasil dan Pembahasan

Salah satu mekanisme toleransi tanaman dalam menghadapi stres kekeringan adalah melakukan perubahan aktivitas fisiologi, yaitu dengan mengakumulasi zat terlarut seperti prolin dan gula total terlarut. Akumulasi zat terlarut tersebut membantu tanaman dalam mempertahankan diri terhadap kondisi kekeringan (Sunarpi, 2003). Prolin berperan sebagai pencegah dehidrasi dan kerusakan sel dengan menyeimbangkan potensial osmotik sitoplasma dengan lingkungan sekitarnya (Al-Bahrany, 2002), membantu meningkatkan toleransi terhadap kekeringan dengan bertindak sebagai penyimpan nitrogen atau sebagai zat terlarut yang meningkatkan potensial solut dalam sitoplasma, sehingga air akan masuk menuju sitoplasma (Gardner dkk.,1991). Sedangkan gula berfungsi menjaga stabilitas membran sel dan melindungi protein (Darbyshire, 1974) serta meningkatkan potensial solut daun sehingga membantu turgiditas ketika tanaman mengalami cekaman kekeringan (Widoretno dan Sudarsono 2004).

④ Evaluasi kandungan prolin dan kandungan gula total terlarut dalam kondisi stres dan non-stres kekeringan dilakukan pada lima genotip kedelai yang mempunyai tingkat toleransi yang berbeda, yaitu Dieng dan MLG2805 dari kelompok toleran, Petek dari

kelompok medium serta Tambora dan Galunggung dari kelompok peka. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan prolin dan gula total terlarut dalam daun mengalami akumulasi seiring dengan menurunnya potensial air, akan tetapi akumulasi prolin lebih tinggi daripada akumulasi gula total terlarut. Kandungan prolin dan gula total terlarut memiliki kecenderungan mengalami peningkatan mulai dari potensial air $-0,03$ MPa sampai $-0,67$ MPa. Akan tetapi peningkatan secara signifikan terjadi pada potensial air $-0,67$ MPa, karena pada potensial air tersebut kedua zat terlarut tersebut mengalami peningkatan yang tinggi terutama pada prolin (Gambar 1).

Pada kondisi cekaman kekeringan, akumulasi prolin meningkat karena proses sintesis prolin dari asam glutamat meningkat, sedangkan proses degradasi membentuk asam glutamat menurun. Dengan demikian, konsentrasi prolin terus meningkat seiring dengan semakin besarnya cekaman kekeringan yang telah diberikan (Caplan dan Lye, 1998). Sedangkan peningkatan gula pada kondisi kekeringan terjadi karena pati yang ada di protoplasma dihidrolisis menjadi gula. Akan tetapi gula yang dihasilkan ditranslokasikan ke titik-titik tumbuh untuk membentuk tunas, daun maupun batang, untuk menahan kelayuan tanaman akibat cekaman kekeringan, sehingga akumulasi gula dalam daun tidak sebesar akumulasi prolin (Salisbury dan Ross, 1995).

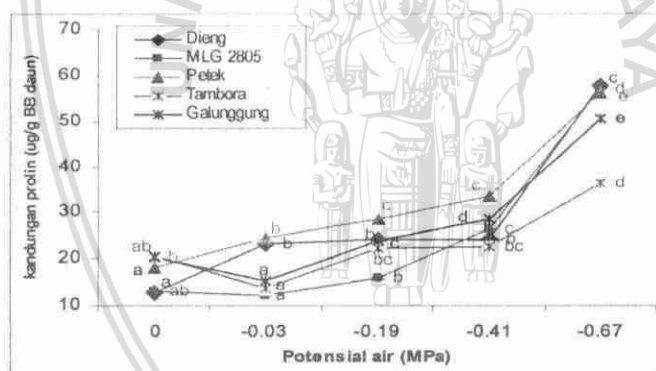


Gambar 1 Pengaruh stres kekeringan pada kandungan prolin dan gula total terlarut pada daun kedelai

Berdasarkan penelitian Jhana dkk. (2001) dan Johnson dkk. (1995) peningkatan kandungan prolin pada daun kacang tanah dan gula pada daun gandum dapat digunakan untuk skrining tingkat toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan. Tanaman yang toleran terhadap cekaman kekeringan mengalami peningkatan kandungan prolin dan gula lebih tinggi daripada tanaman yang peka. Sebaliknya, hasil penelitian Newton dkk. (1986) dan Newton dkk. (1985) menunjukkan kandungan prolin dan gula total terlarut pada kalus dari varietas sorghum yang toleran terhadap cekaman kekeringan mengalami

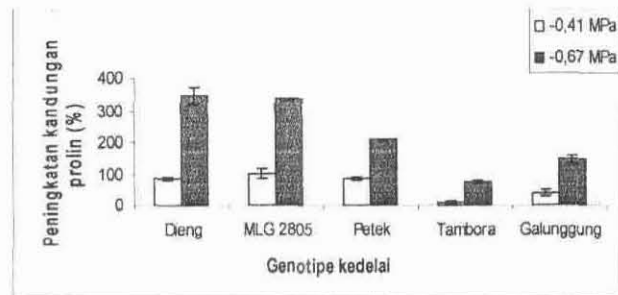
peningkatan lebih rendah dibandingkan dengan varietas yang peka. Hal ini dikarenakan, pada kondisi cekaman kekeringan proses penurunan potensial air kalus pada varietas peka terjadi lebih cepat daripada varietas yang toleran, sehingga mengakibatkan proses sintesis prolin dan gula total terlarut meningkat lebih tinggi. Prolin dan gula total terlarut pada tanaman sorghum berperan sebagai *osmoprotectant*. Dengan semakin meningkatnya prolin dan gula total terlarut diharapkan mampu mempertahankan tekanan turgor dengan mengatur potensial osmotik pada kalus, sehingga kalus yang peka dapat melakukan pertumbuhan walaupun dalam kondisi kekeringan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, penurunan potensial air mengakibatkan peningkatan akumulasi prolin pada 5 genotipe kedelai yang diujikan. Akan tetapi, masing-masing genotipe memberikan respon akumulasi prolin yang bervariasi. Peningkatan kandungan prolin paling tinggi terjadi pada potensial -0.67 MPa (Gambar 2). Pola peningkatan kandungan prolin pada varietas toleran Dieng dan MLG2805 serta varietas medium Petek membentuk pola yang teratur. Sedangkan pola peningkatan prolin pada varietas peka Galunggung dan Tambora, menunjukkan pola yang tidak teratur dengan mengalami penurunan kandungan prolin pada potensial air $-0,03$ MPa.



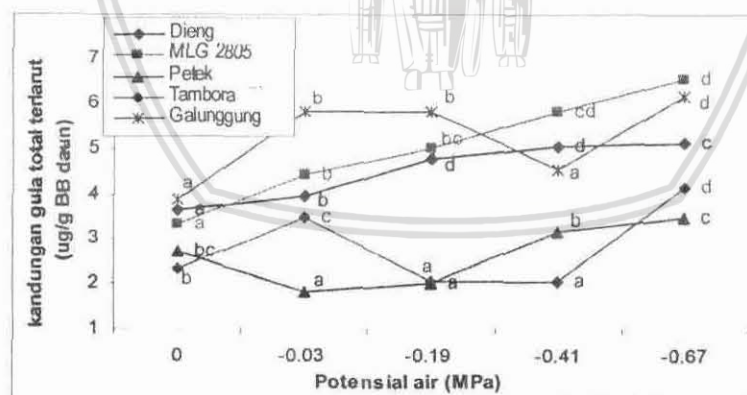
Gambar 2 Pengaruh stres kekeringan pada kandungan prolin dari daun kedelai genotipe toleran, medium dan peka

Pada potensial air $-0,67$ MPa peningkatan kandungan prolin antara genotipe toleran (Dieng dan MLG2805), medium toleran (Petek) serta peka (Tambora dan Galunggung) pada potensial air $-0,67$ MPa mengalami perbedaan. Kandungan prolin pada genotipe toleran dan medium meningkat lebih tinggi dibandingkan dengan genotipe peka. Genotipe Dieng dan MLG 2805 mengalami peningkatan prolin lebih dari 300% dibandingkan dengan kandungan prolin pada kontrol. Pada varietas medium Petek kandungan prolin meningkat lebih dari 200%, sedangkan varietas peka Tambora dan Galunggung mengalami peningkatan kandungan prolin kurang dari 150% (Gambar 3).



Gambar 3 Peningkatan kandungan prolin genotipe toleran, medium dan peka pada potensial air -0,41 MPa dan -0,67 MPa

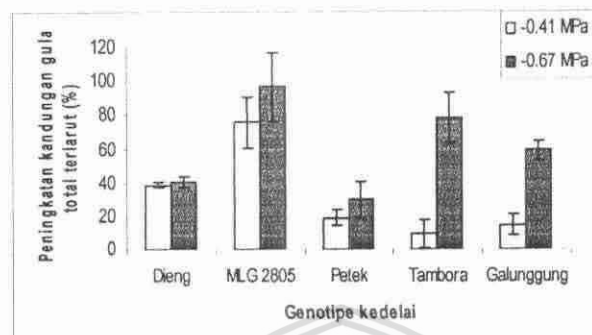
Penurunan potensial air juga meningkatkan kandungan gula terlarut pada daun beberapa genotipe kedelai. Peningkatan kandungan gula total terlarut pada 5 genotipe kedelai yang diujikan menghasilkan pola yang bervariasi, antara varietas yang toleran, medium dan peka (Gambar 4). Varietas toleran Dieng dan MLG 2805 memiliki pola peningkatan yang teratur. Varietas medium Petek mengalami penurunan kandungan gula pada potensial air -0,03 MPa dan -0,19 MPa, namun demikian polanya tidak terlalu mengalami fluktuasi. Sedangkan varietas peka Tambora dan Galunggung mengalami fluktuasi lebih besar dibandingkan dengan varietas toleran dan medium. Secara umum kandungan gula total terlarut mengalami peningkatan mulai dari potensial air -0,03 sampai -0,67 MPa. Peningkatan paling tinggi terjadi pada potensial air -0,67 MPa, kecuali pada varietas Dieng. Pada varietas Dieng peningkatan paling tinggi terjadi pada potensial air -0,41 MPa.



Gambar 4. Pengaruh stres kekeringan pada kandungan gula total terlarut dari daun kedelai genotipe toleran, medium dan peka

Pada kandungan gula total terlarut peningkatan paling tinggi juga terjadi pada potensial air -0,67 MPa. Pada varietas toleran Dieng dan MLG2805, kandungan gula total terlarut mengalami peningkatan sebesar 40 % dan 97%. Pada varietas medium Petek peningkatan kandungan gula total terlarut berada pada posisi paling rendah,

sedangkan varietas peka Tambora dan Galunggung mengalami peningkatan lebih besar dibandingkan dengan varietas toleran (Gambar 5). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan kandungan gula total terlarut dalam kondisi cekaman kekeringan tidak berkorelasi dengan tingkat toleransi kekeringan varietas kedelai di lapang.



Gambar 5 Peningkatan kandungan gula total terlarut genotipe toleran, medium dan peka pada potensial air -0,41 MPa dan -0,67 Mpa

Peningkatan akumulasi prolin dan gula total pada daun kedelai menyebabkan tanaman lebih bersifat toleran terhadap cekaman kekeringan. Hal ini dikarenakan semakin meningkatnya akumulasi prolin dan gula total terlarut pada daun kedelai, potensial air pada daun lebih negatif (mengalami penurunan) dibandingkan dengan potensial air pada tanah, sehingga air melakukan pergerakan menuju ke daerah yang memiliki potensial lebih rendah, yaitu dari tanah menuju ke daun tanaman. Dengan demikian, tanaman mampu mempertahankan turgiditas daun ketika mengalami cekaman kekeringan (Salisbury dan Ross, 1995., Belhassen dan Monneveux, 1996).

Kesimpulan

Cekaman kekeringan dapat menghambat pertumbuhan tinggi tanaman, jumlah daun, luas daun, panjang internodus, dan biomassa akar dan tajuk. Semakin lama dan semakin besar cekaman kekeringan, semakin tinggi penghambatan pada pertumbuhan vegetatif.

Penurunan potensial air mampu meningkatkan akumulasi prolin dan gula total terlarut pada daun kedelai. Peningkatan zat terlarut tersebut bervariasi diantara 5 genotipe kedelai yang diuji. Akumulasi prolin dapat digunakan sebagai indikator toleransi kekeringan, dengan varietas toleran mengalami peningkatan akumulasi prolin lebih tinggi dengan kecenderungan memiliki pola yang teratur, dibandingkan dengan varietas peka. Sedangkan peningkatan akumulasi gula total terlarut dalam kondisi cekaman kekeringan tidak berkorelasi dengan tingkat toleransi kekeringan pada varietas kedelai.

Daftar Pustaka

- Al-Bahrany A.M. 2002. Callus Growth and Proline Accumulation in Response to Polyethylene Glycol Induced Osmotic Stress in Rice, *Oryza sativa* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences* V 12 : 1294-1296.
- Bates, L.S., R.P. Waldre dan I.D Teare. 1973. Rapid Determination of Free Praline for Water Stress Studies. *Plant and Soil*. 39:205-207.
- Belhassen E. dan P. Monneveux. 1996. The Diversity of Drought Adaptation in the Wide. *Plant Growth Regulation*. 20: 85-92.
- Caplan, A dan S. Iyer. 1998. Product of Prolin Catabolism can Induce Osmotically Regulated Gene in Rice. *Plant Physiol*. 116 : 203 -211.
- Deptan. 2001. Upaya Bangkit Kedelai. [http://www.deptan.go.id/ditjntp/KabiOK/Bangkit % 2001. htm](http://www.deptan.go.id/ditjntp/KabiOK/Bangkit%2001.htm). diakses tanggal 1 Maret 2005.
- Darbyshire B. 1974. The Function of The Carbohydrate Units of Three Fungal enzymes in Their resistance to Dehydration. *Plant Physiol*. 54 : 717-721.
- Gardner, F. P., R. B. Pearce dan Mitchell. 1991. Fisiologi Tanaman Budidaya Cetakan Pertama. Penerjemah H. Susilo. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Irigoyen J., D.W Emerich dan M Sanches-Diaz. 1992. Water Stress Induced Changes in Concentration of Proline And Total Soluble Sugars in Nodulated Alfafa (*Medicago Sativa*) Plants. *Physiol Plant*. 84:55-60.
- Jhana, D.E., B.L.D. Chowdury, M.A.Haque, M.R.H. Bhulyan dan M.M. Husain. 2001. Biochemical Screening of Some Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes for Drought Tolerance. *Biological Sciences* I(11): 1009-1011.
- Johnson J. W. dan B. Huang. 1995. Root Respiration and Carbohydrate Status of Two Wheat Genotypes in Response to Hipoxia. *Annals of Botany*. 75: 427-432.
- Kisman. 2003. Effect of Drought Stress on Growth dan Yield of Soybean. <http://rudvet.topcities.com/pps70271034/kisman.htm>. diakses 10 desember 2005.
- Mexal, J., James T. Fisher, Janet O. dan C. P. Patrick R. 1975. Oxygen Availability in Polyethylene Glycol Solutions and its Implications in Plants – Water Relations. *Plant Physiol*. 55 : 20-24.
- Newton, J.R., H.S. Roberta dan S. Bhaskaran. 1985. Physiological Changes in Cultured Sorghum Cells in response to Induced Water Stress. I. Free Prolin. *Plant Physiol* .79: 266-269.
- Newton, J.R., H.S. Roberta, S. Bhaskaran dan J. D. Puryear. 1986. Physiological Changes in Cultured Sorghum Cells in response to Induced Water Stress. II. Soluble Carbohydrate and Organic Acids. *Plant Physiol*. 81 : 626-629.

- Pantalone V. R. , W. J. Kenworthy, L. H. Slaughter dan B. R. James. 1997. Chloride Tolerance in Soybean and Perennial Glycine Accession. *Eupytica*. 97 (2) : 235-239.
- Pattanagul, W. dan M. A. Madore. 1999. Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiol*. 121: 987-993.
- Rodriguez, H. G.. 1997. Growth, Water Relations and Accumulations of Organic Solutes in Roots of Maize Seedling During Salt Stress. *Plant Physiol*. 113: 881-893.
- Salisbury F.B. dan Ross C.W. 1995. Fisiologi Tumbuhan I. Diterjemahkan oleh Lukman D.R. dan Sumaryono. Penerbit ITB. Bandung.
- Suharjawanasuria. 2001. Produksi Kedelai Nasional Belum Mencukupi. <http://www.agribisnis.tripod.com/bahanbaku.02.htm>. diakses tanggal 6 Februari 2005.
- Suhartina. 2003. Perkembangan dan Deskripsi Varietas Unggul Kedelai 1918-2002. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Malang.
- Sunarpi. 2003. Akumulasi Beberapa Metabolit di Sistem Perakaran Tanaman Kedelai yang Diberikan Nitrogen dan Sulfur pada Kondisi Defisit Air. *Jurnal Biologi Tropis*. 4 : 58-63.
- Sugito, Y. 1999. Ekologi Tanaman. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Widoretno, W. dan Sudarsono. 2004. Evaluasi Sejumlah Galur Kedelai Varian Somaklonal Hasil Seleksi *In Vitro* terhadap Stress Kekeringan. *Hayati* (11) 1 : 11-20.