

**PENGARUH STRES KEKERINGAN YANG DISIMULASI  
DENGAN POLIETILENA GLIKOL TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE, KATALASE, DAN  
PEROKSIDASE PADA EMBRIO SOMATIK KEDELAI  
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

**SKRIPSI**

oleh :  
**NURUL HUDA**  
**0410910040-91**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2009**



**PENGARUH STRES KEKERINGAN YANG DISIMULASI  
DENGAN POLIETILENA GLIKOL TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE, KATALASE, DAN  
PEROKSIDASE PADA EMBRIO SOMATIK KEDELAI  
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

**SKRIPSI**

oleh :  
**NURUL HUDA**  
**0410910040-91**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2009**



**PENGARUH STRES KEKERINGAN YANG DISIMULASI  
DENGAN POLIETILENA GLIKOL TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE, KATALASE, DAN  
PEROKSIDASE PADA EMBRIO SOMATIK KEDELAI  
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains  
dalam bidang Biologi

oleh :  
**NURUL HUDA**  
**0410910040-91**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2009**



**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**PENGARUH STRES KEKERINGAN YANG DISIMULASI  
DENGAN POLIETILENA GLIKOL TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE, KATALASE, DAN  
PEROKSIDASE PADA EMBRIO SOMATIK KEDELAI  
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

oleh :  
**NURUL HUDA**  
**0410910040-91**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 9 Juli 2009  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

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

**Ir. Retno Mastuti MAgSc. DAgSc.**  
**NIP. 131 879 408**

**Mengetahui**  
**Ketua Jurusan Biologi**  
**Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Dr. Sri Rahayu M.Kes**  
**NIP. 131 652 677**

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nurul Huda  
NIM : 0410910040-91  
Jurusan : Biologi  
Judul skripsi :

**PENGARUH STRES KEKERINGAN YANG DISIMULASI  
DENGAN POLIETILENA GLIKOL TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE, KATALASE, DAN  
PEROKSIDASE PADA EMBRIO SOMATIK KEDELAI  
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari Skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakkan, maka saya bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 9 Juli 2009  
Yang menyatakan,

NURUL HUDA  
NIM. 0410910040 - 91

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



**PENGARUH STRES KEKERINGAN YANG DISIMULASI  
DENGAN POLIETILENA GLIKOL TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE, KATALASE, DAN  
PEROKSIDASE PADA EMBRIO SOMATIK KEDELAI  
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh stres kekeringan yang disimulasi dengan Polietilena glikol (PEG) terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai dan mengetahui hubungan antara aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada embrio somatik (ES) kedelai dengan tingkat toleransi kedelai terhadap stres kekeringan. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial yang terdiri atas dua faktor, yaitu varietas kedelai (Dieng dan Burangrang) dan konsentrasi PEG (0%, 5%, 10%, 15% masing-masing setara dengan potensial air 0; -0,03; -0,19; -0,41 MPa). Simulasi stres kekeringan pada ES kedelai dilakukan dengan menanam ES kedelai pada media perlakuan PEG. Embrio somatik diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 24-25°C selama satu bulan dan dianalisis respon pembentukan ES kedelai dan aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase. Stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG berpengaruh terhadap respon pembentukan ES kedelai dan aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai. Polietilena glikol menghambat pembentukan ES kedelai. Pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase tergantung pada tingkat toleransi varietas kedelai yang diuji. Di bawah kondisi stres kekeringan terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas toleran dan penurunan aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas peka. Aktivitas enzim katalase di bawah kondisi stres kekeringan pada ES kedelai varietas peka cenderung meningkat, tetapi pada varietas toleran tidak begitu terjadi perubahan. Sedangkan aktivitas enzim SOD di bawah kondisi stres kekeringan pada ES kedelai varietas toleran tidak ada perbedaan perubahan dibandingkan dengan varietas peka.

Kata kunci : ES kedelai, katalase, PEG, peroksidase, SOD, stres kekeringan

repository.ub.ac

**EFFECT OF POLYETHYLENE GLYCOL-SIMULATED  
DROUGHT STRESS TO SUPEROXIDE DISMUTASE,  
CATALASE, AND PEROXIDASE ENZYME ACTIVITIES IN  
SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merr.) SOMATIC EMBRYO**

**ABSTRACT**

The objectives of this experiment were to observe the influence of polyethylene glycol (PEG)-simulated drought stress to superoxide dismutase (SOD), catalase, and peroxidase enzyme activities and the relationship between the enzyme activities in soybean somatic embryo (SE) and tolerance level of soybean to drought stress. This experiment used Factorial Randomized Complete Design with two factors consisted of soybean varieties (Dieng and Burangrang) and PEG concentrations (0%, 5%, 10%, 15%, which equivalent with water potential level 0; -0,03; -0,19; -0,41 Mpa). Drought stress simulation in soybean ES was done by growing soybean SE on medium PEG treatment. Somatic embryo was incubated on dark condition in 24-25°C during one month and the response of soybean SE formation and the enzyme activity was analysed. Polyethylene glycol-simulated drought stress effected soybean SE formation and SOD, catalase, and peroxidase enzyme activities in soybean SE. Polyethylene glycol impede to soybean SE formation. Drought stress effected SOD, catalase, and peroxidase enzyme activities in soybean SE depend on tolerance level of soybean varieties tested. Peroxidase enzyme activity increase in tolerant soybean SE variety and decrease in sensitive soybean SE variety on under drought stress condition. Catalase enzyme activity increase, but not significant in sensitive soybean SE variety on under drought stress condition and catalase enzyme activity in tolerant soybean SE variety same with control. But SOD enzyme activity not different change between the tolerant soybean SE variety with the sensitive soybean SE variety on under drought stress condition.

Key words : catalase, drought stress, PEG, peroxidase, SOD, soybean SE

## KATA PENGANTAR

*Bismillahirrohmanirrohim.* Segala puji hanya bagi Allah SWT dengan kekuatan, kuasa, petunjuk, rahmat, anugerah dan ridho-Nya, maka akhirnya penulis dapat menyelesaikan penelitiannya yang berjudul **“Pengaruh Stres kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase pada Embrio Somatik Kedelai (*Glycine Max (L.) Merr.*)”**. Besar harapan penulis agar penelitian ini memberi manfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan. Penelitian yang panjang, penuh perjuangan dan kesabaran, tak lepas dari peran serta semua pihak yang telah membantu terselesaikannya penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Wahyu Widoretno, M.Si. selaku pembimbing I, yang dengan sabar dan besar hati memberikan bimbingan dan petunjuk, baik dalam penelitian maupun penulisan skripsi.
2. Ir. Retno Mastuti, MAgSc. DagSc. selaku pembimbing II yang dengan teliti dan sabar memberikan arahan dan bimbingan dalam penulisan skripsi.
3. Dr. Sri Rahayu M.Kes selaku Ketua Jurusan Biologi dan Bapak/Ibu dosen pengajar Jurusan Biologi yang telah membagi ilmu dan pengetahuannya.
4. Orangtua, adik, dan seluruh keluarga besar penulis yang telah memberikan segalanya baik secara spritual dan material serta semangat dalam berbagai hal.
5. Teman-teman (Debby&Elly khususnya dan *Biogenique* pada umumnya) yang telah memberikan doa, semangat, dukungan, bantuan dan kebersamaannya.
6. Laboran FKM yang telah membantu kelancaran penelitian.
7. Seluruh civitas di Jurusan Biologi dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih terdapat banyak kekurangan dan jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun demi perbaikan penelitian selanjutnya sangat penulis harapkan.

Malang, 9 Juli 2009

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	v
<b>ABSTRAK</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Permasalahan .....	3
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Tinjauan Umum Kedelai .....	4
2.2 Seleksi <i>In Vitro</i> terhadap Stres Kekeringan menggunakan Polietilena Glikol .....	5
2.3 Respon Tumbuhan terhadap Stres Kekeringan .....	7
2.4 Pengaruh Stres Kekeringan terhadap <i>Reactive</i> <i>Oxygen Species</i> .....	8
2.5 Peran Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase terhadap Produksi <i>reactive oxygen</i> <i>species</i> .....	10
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	14
3.1 Waktu dan Tempat .....	14
3.2 Rancangan Percobaan .....	14
3.3 Pembuatan Media .....	14
3.4 Induksi dan Pemeliharaan Embrio Somatik .....	15
3.5 Perlakuan Uji Pengaruh Stres Kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol pada Embrio Somatik Kedelai .....	15

3.6 Evaluasi Pengaruh Stres Kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol terhadap Pembentukan Embrio Somatik Kedelai..... 16

3.7 Evaluasi Pengaruh Stres Kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase pada Embrio Somatik Kedelai..... 16

3.8 Analisis Data..... 18

**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN** ..... 19

4.1 Respon Pembentukan Embrio Somatik Kedelai pada Media Yang Mengandung Polietilena Glikol ..... 19

4.2 Pengaruh Stres Kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase pada Embrio Somatik Kedelai ..... 22

4.3 Hubungan Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase pada Embrio Somatik Kedelai Varietas Toleran dan Peka pada Media yang Mengandung Polietilena Glikol dengan Tingkat Toleransi Kedelai Terhadap Stres Kekeringan..... 24

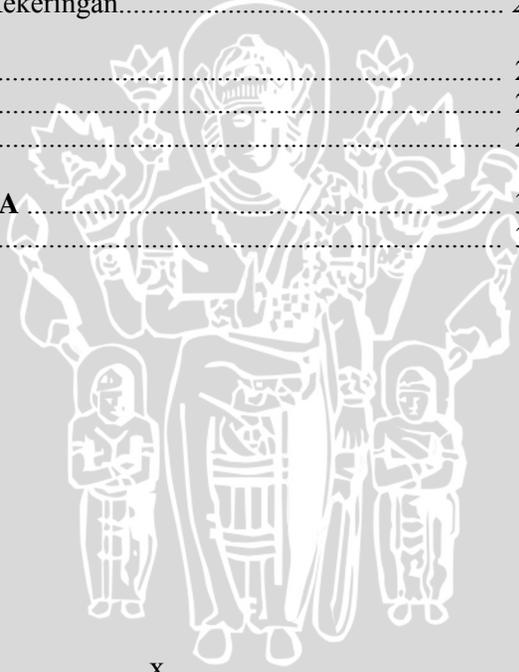
**BAB V PENUTUP** ..... 29

5.1. Kesimpulan ..... 29

5.2. Saran ..... 29

**DAFTAR PUSTAKA** ..... 30

**LAMPIRAN** ..... 38



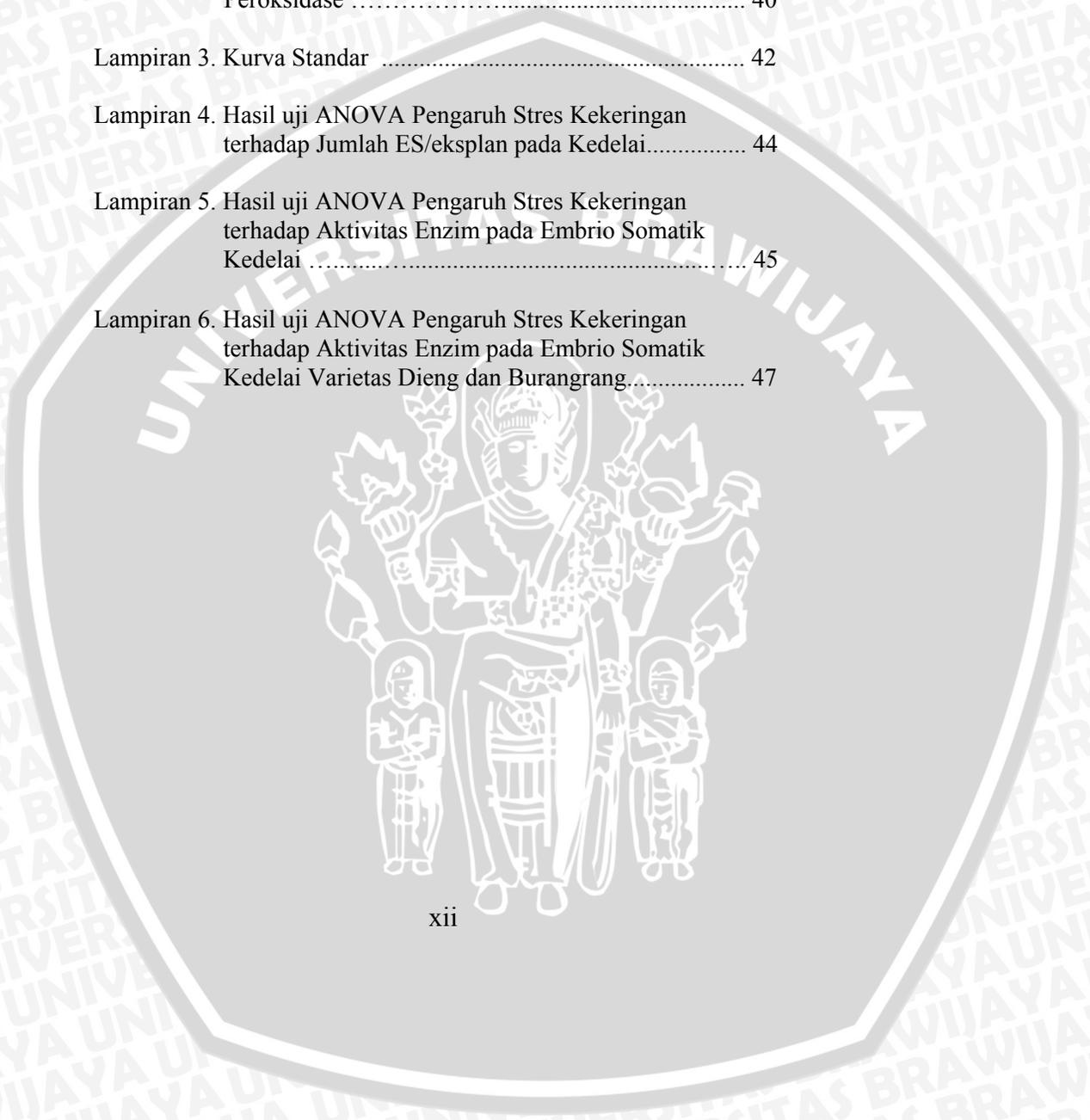
## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Jalur <i>Reactive oxygen species</i> .....	10
Gambar 2.2 Aktivitas SOD dan katalase terhadap ROS .....	11
Gambar 4.1 Embrio somatik kedelai varietas Dieng (toleran) dan Burangrang (peka) yang terbentuk pada media yang mengandung PEG .....	19
Gambar 4.2 Respon pembentukan ES kedelai varietas Dieng (toleran) dan Burangrang (peka) pada media yang mengandung PEG.....	20
Gambar 4.3 Persentase penurunan pembentukan ES kedelai varietas Dieng (toleran) dan Burangrang (peka) pada media yang mengandung PEG dibandingkan dengan kontrol.....	21
Gambar 4.4 Pengaruh stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai.....	23
Gambar 4.5 Pengaruh PEG terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai varietas Dieng (toleran) dan Burangrang (peka).....	26



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1. Media Induksi dan Pemeliharaan Embrio Somatik Kedelai .....	38
Lampiran 2. Komposisi Larutan untuk Analisis Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase .....	40
Lampiran 3. Kurva Standar .....	42
Lampiran 4. Hasil uji ANOVA Pengaruh Stres Kekeringan terhadap Jumlah ES/eksplan pada Kedelai.....	44
Lampiran 5. Hasil uji ANOVA Pengaruh Stres Kekeringan terhadap Aktivitas Enzim pada Embrio Somatik Kedelai .....	45
Lampiran 6. Hasil uji ANOVA Pengaruh Stres Kekeringan terhadap Aktivitas Enzim pada Embrio Somatik Kedelai Varietas Dieng dan Burangrang.....	47



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kedelai mempunyai kontribusi dalam penyediaan bahan pangan bergizi bagi manusia. Kedelai disebut sebagai *Gold from the Soil* karena kualitas asam amino proteinnya yang tinggi, seimbang dan lengkap. Selain itu, jika dibandingkan dengan protein yang berasal dari hewani maka protein yang berasal dari kedelai lebih murah dan terjangkau bagi masyarakat. Oleh karena itu, terjadi peningkatan konsumsi kedelai oleh masyarakat, berdasarkan bertambahnya populasi penduduk, kesadaran masyarakat akan gizi, dan peningkatan pendapatan per kapita (Suharjawanasuria, 2001). Adanya perkembangan industri yang menggunakan bahan-bahan kedelai juga meningkatkan kebutuhan kedelai di Indonesia (Pitojo, 2003). Namun peningkatan kebutuhan kedelai tidak sebanding dengan produktivitasnya. Menurut BPS (2007), produktivitas kedelai di Indonesia pada tahun 2007 menurun sebesar 3,51 ribu ton (0,47%) dibandingkan tahun 2006.

Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas kedelai di Indonesia adalah dengan penanaman kedelai pada lahan kering. Namun tidak semua varietas kedelai dapat tumbuh dengan baik pada lahan kering, sehingga diperlukan suatu varietas kedelai yang toleran terhadap stres kekeringan. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mendapatkan varietas kedelai yang toleran terhadap stres kekeringan adalah seleksi *in vitro* (Hutami dkk., 2006), karena dapat dilakukan seleksi pada sekelompok sel (Husni dkk., 2004). Seleksi *in vitro* menggunakan embrio somatik (ES) dapat menunjukkan tingkat toleransi yang sama apabila diterapkan pada tingkat spesies dan juga diperoleh sifat-sifat yang belum diketahui sebelumnya sehingga dapat menjadi sumber plasma nutfah yang baru (Barwale dan Widholm, 1990).

Salah satu metode seleksi *in vitro* terhadap stres kekeringan dapat digunakan senyawa osmotik seperti polietilena glikol (PEG) karena dapat mensimulasi kondisi stres kekeringan pada media kultur (Dami dan Hughes, 1997). Polietilena glikol sebagai komponen seleksi pada massa sel embrionik akan menguntungkan karena memberikan tekanan seleksi yang seragam pada populasi sel yang berjumlah jutaan. Polietilena glikol adalah polimer etilena

oksida panjang yang mempunyai berat molekul yang tinggi (4000-8000) (Blum, 1988), bersifat stabil, non ionik, dan larut dalam air (Lawyer, 1970 *dalam* Korbes dan Droste, 2005). Short dkk. (1987) menyatakan bahwa PEG dalam kultur *in vitro* dapat mensimulasi stres kekeringan yang sama dengan kondisi stres kekeringan di lapang atau rumah kaca. Pada kultur *in vitro* menunjukkan bahwa penambahan PEG dalam media kultur dapat menghambat pembentukan ES pada varietas kedelai berdaya hasil rendah (Wardiani, 2005), dan pada varietas kedelai berdaya hasil tinggi (Risyiati, 2005), serta pengaruh PEG terhadap karakteristik fisiologi untuk toleransi terhadap stres kekeringan (Aji, 2005).

Stres kekeringan merupakan salah satu stres abiotik yang disebabkan oleh adanya penurunan potensial osmotik dalam sel. Stres kekeringan mempengaruhi setiap aspek dalam pertumbuhan tumbuhan, termasuk anatomi, fisiologi, morfologi dan biokimia (Kisman, 2003). Stres kekeringan dapat menyebabkan stres oksidatif yang menginduksi kerusakan sel yang terjadi sebagai hasil dari pembentukan *reactive oxigen species* (ROS) (Slater dkk., 2003). Zidenga (2006) menjelaskan bahwa ROS merupakan sinyal transduksi utama yang dikaitkan dengan stres kekeringan dan stres lingkungan lainnya. *Reactive oxigen species* berfungsi mengontrol dan meregulasi proses biologis, seperti siklus sel, kematian sel, sinyal hormon, respon stres abiotik ataupun biotik, pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan (Anonymous, 2006). Peningkatan ROS dipengaruhi oleh stres kekeringan (Ukeda, 2002), salinitas tinggi, *heat shock*, kelebihan logam berat, radiasi ultra violet (UV), stres mekanik, kekurangan nutrisi, serangan patogen, intensitas cahaya tinggi, polusi udara, seperti ozon dan SO<sub>2</sub> (Serres dan Mittler, 2007), dan herbisida, serta kelebihan air (Harinasut dkk., 2003). Menurut Serres dan Mittler (2007) ROS, seperti *singlet* oksigen (O<sub>2</sub><sup>1</sup>), radikal superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dan radikal hidroksil (HO<sup>•</sup>) bersifat sangat reaktif serta menyebabkan kerusakan sel melalui oksidasi protein.

Tumbuhan mempunyai mekanisme pertahanan terhadap ROS melalui aktivitas enzim antioksidan, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan peroksidase (Serres dan Mittler 2007). Superoksida dismutase akan mendismutasi radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, sedangkan katalase dan peroksidase mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air

(Anonymous, 2006). Tomat dalam kondisi stres kekeringan (Unyayar dan Cekic, 2004) dan kultivar *Mulberry* (*Morus* sp.) dalam kondisi stres garam mengalami peningkatan aktivitas enzim antioksidan (Harinasut dkk., 2003). Berdasarkan peran enzim SOD, katalase, dan peroksidase dalam mekanisme pertahanan tumbuhan terhadap ROS, maka tingkat aktivitas enzim tersebut pada ES kedelai diharapkan dapat menjadi salah satu indikator tingkat toleransi terhadap stres kekeringan sehingga menunjang upaya perkembangan varietas kedelai yang toleran kekeringan melalui seleksi *in vitro*.

## 1.2 Permasalahan

Permasalahan yang mendasari penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana pengaruh stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai?
2. Bagaimana hubungan antara aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai dengan tingkat toleransi kedelai terhadap stres kekeringan?

## 1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai. Selain itu juga mengetahui hubungan antara aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai dengan tingkat toleransi kedelai terhadap stres kekeringan.

## 1.4 Manfaat

Manfaat yang dihasilkan dari penelitian ini, diharapkan dapat diperoleh indikator tingkat toleransi kedelai terhadap stres kekeringan melalui aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai. Dengan demikian dapat digunakan untuk menentukan varietas kedelai yang toleran atau peka terhadap stres kekeringan dalam seleksi *in vitro*.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Umum Kedelai

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) merupakan terna tahunan, tumbuh menjalar atau tegak dengan tinggi 0,2-1,5 m. Batang berbulu kecoklatan atau keabuan, bercabang dan berkayu. Berdaun tiga, daun terletak berseling, dan berbentuk bundar serta ujung daun meruncing hingga menumpul. Bunga kecil, berbentuk kupu-kupu, berwarna ungu atau putih dan bentuk polong agak melengkung (Wardiyono, 2007).

Kedelai mempunyai kontribusi dalam penyediaan bahan pangan bergizi bagi manusia karena kualitas asam amino proteinnya yang tinggi, seimbang dan lengkap. Setiap 100 gram kedelai kering mengandung 34,90 gram protein, 331,00 kalori, 18,10 gram lemak serta berbagai vitamin dan mineral lainnya (Suharjawanasuria, 2001). Produksi kedelai tahun 2006 sebesar 781 ribu ton biji kering, turun sekitar 27 ribu ton (3,40%) dibandingkan tahun 2005 yang produksinya sebesar 797 ribu ton biji kering. Selanjutnya produksi kedelai tahun 2007 juga mengalami penurunan sebesar 3,51 ribu ton (0,47%) sehingga hanya memproduksi sebesar 745,53 ribu ton biji kering. Penurunan produksi kedelai tersebut disebabkan oleh penurunan luas panen. Luas panen menurun sebanyak 7,44 ribu hektar (1,28 %) (BPS, 2007).

Kedelai mempunyai banyak manfaat, antara lain: sebagai bahan industri (sabun, plastik, lilin) dan bahan baku makanan olahan pada industri kecil (kecap, tahu, tempe, dan susu fermentasi) (Siagian, 2003). Menurut Wanodyatama (2004) kedelai juga dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak dan sebagai pupuk hijau. Dalam bidang kesehatan, kedelai dapat menurunkan kolesterol, mencegah kelebihan berat badan, menurunkan tekanan darah tinggi, mengurangi resiko kanker prostat dan dapat meningkatkan kesehatan tulang.

Selama kurun waktu 1918 hingga 2002 Pemerintah Indonesia telah berhasil melepaskan sebanyak 55 varietas unggul kedelai dengan karakteristik umur polong masak, ukuran biji dan hasil biji pada keragaman yang cukup besar. Varietas tersebut antara lain Dieng (dilepas tahun 1992) dan Burangrang (dilepas tahun 1999) (Suhartina, 2003).

## 2.2 Seleksi *In Vitro* terhadap Stres Kekeringan menggunakan Polietilena Glikol

Pengembangan varietas yang toleran terhadap stres kekeringan dapat mendukung peningkatan keragaman somaklonal. Keragaman somaklonal merupakan keragaman genetik yang dihasilkan melalui kultur jaringan. Menurut Wattimena (1992) keragaman somaklonal berasal dari keragaman genetik eksplan dan keragaman genetik yang terjadi di dalam kultur jaringan. Salah satu metode untuk meningkatkan keragaman somaklonal yang banyak digunakan adalah seleksi *in vitro*. Metode seleksi *in vitro* lebih efektif dan efisien karena perubahan sifat yang terjadi sesuai dengan yang diharapkan (Mariska, 2002; Hutami dkk., 2006). Menurut Husni dkk. (2004) dan Ahlowalia (1986) melalui metode ini dapat dihasilkan varietas yang toleran terhadap stres biotik ataupun abiotik.

Metode seleksi *in vitro* sangat cocok digunakan untuk mendapatkan varietas yang toleran terhadap kekeringan, karena dapat dilakukan skrining pada sekelompok sel untuk mendapatkan sel mutan pada kondisi yang seragam pada lingkungan yang terbatas. Ada tiga hal penting yang perlu diperhatikan dalam seleksi *in vitro*. Pertama, sistem regenerasi pada sel atau kalus yang resisten terhadap komponen seleksi. Kedua, kemampuan sel atau kalus untuk memelihara kestabilan genetik ketahanan pada material yang diseleksi. Ketiga, perubahan genetik pada proses seleksi tidak hanya sekedar adaptasi fisiologis (Husni dkk., 2004).

Husni dkk. (2004) menyatakan bahwa perbaikan varietas melalui seleksi *in vitro* telah banyak dimanfaatkan pada berbagai jenis varietas dan telah terbukti dapat menghasilkan varietas baru, seperti pada penelitian Mariska (2002) yang menerapkan metode seleksi *in vitro* pada panili, lada, dan kedelai. Menurut Hutami dkk. (2006) seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap faktor biotik dan abiotik dapat dilakukan dengan pemberian komponen seleksi ke dalam media. Berbagai komponen seleksi, seperti radiasi sinar gamma, aluminium (Al) dan pH rendah, polietilena glikol (PEG), dan lain-lain dapat digunakan untuk meningkatkan keragaman somaklonal pada berbagai jenis tanaman. Seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap stres kekeringan dapat disimulasi dengan senyawa osmotikum sebagai komponen seleksi (Hutami dkk., 2006). Beberapa senyawa osmotikum tersebut, antara lain garam, gula, dan PEG. Akan tetapi, senyawa osmotikum yang paling baik digunakan

adalah PEG (Mexal dkk., 1974).

Seleksi *in vitro* menggunakan PEG pada massa sel embrionik dapat memberikan tekanan seleksi yang seragam pada populasi sel. Polietilena glikol bersifat stabil, non ionik, dan polimer etilena oksida yang panjang dan larut dalam air serta dapat digunakan dalam sebaran berat molekul yang luas (Lawyer, 1970). Menurut Blum (1988) berat molekul PEG 4000-8000 sering digunakan untuk penelitian fisiologi tumbuhan sebagai penyimulasi kondisi stres kekeringan yang terkontrol pada media kultur dan juga tidak menyebabkan keracunan (Lawyer, 1970 dalam Korbes dan Droste, 2005). Polietilena glikol mempunyai molekul yang besar sehingga tidak mampu untuk melewati dinding sel dan membatasi penerimaan air pada sel, menurunkan tekanan turgor serta potensial osmotik yang lebih negatif di intraseluler (Korbes dan Droste, 2005). Selain itu Short dkk. (1987) menyatakan bahwa PEG dalam kultur *in vitro* dapat mensimulasi stres kekeringan yang berkolerasi positif dengan yang terjadi di lapang atau rumah kaca karena PEG dapat mengikat air. Seleksi massa sel dengan PEG (25, 50, dan 75%) dilakukan untuk memperoleh mutan yang toleran terhadap kekeringan (Hutami dkk., 2006).

Seleksi *in vitro* dilakukan pada massa sel embrionik, seperti ES dapat menunjukkan tingkat toleransi yang sama apabila diterapkan pada tingkat spesies dan juga dapat dihasilkan sifat-sifat yang belum diketahui sebelumnya sehingga dapat menjadi sumber plasma nutfah yang baru (Barwale dan Widholm, 1990). Menurut Merkle dkk. (1990) sensitivitas embrio somatik yang tinggi terhadap suatu senyawa dapat mengganggu metabolisme tumbuhan sehingga diduga sebagai karakteristik intrinsik untuk mengidentifikasi sifat toleran suatu varietas terhadap faktor-faktor abiotik dan biotik.

Evans dkk. (2003) menjelaskan bahwa embrio somatik (ES) dapat dihasilkan melalui regenerasi kalus dan suspensi sel. Embrio somatik yang ditumbuhkan pada media tertentu dapat membentuk bunga dan biji. Embrio somatik biasanya berasal dari sel tunggal yang kompeten dan berkembang membentuk fase globuler, hati, torpedo, dan akhirnya menjadi ES dewasa yang siap dikecambahkan membentuk planlet (Pardal dkk., 2004).

### 2.3 Respon Tumbuhan terhadap Stres Kekeringan

Stres kekeringan merupakan salah satu masalah yang dapat membatasi produksi kedelai pada daerah tropis. Besarnya pengaruh stres kekeringan pada pertumbuhan dan hasil panen kedelai tergantung pada fase pertumbuhan dan tingkat kekeringan (Palmer dkk., 1996). Stres kekeringan mempengaruhi setiap aspek dalam pertumbuhan tumbuhan, termasuk anatomi, fisiologi, morfologi dan biokimia. Menurut Fitter dan Hay (1991) stres kekeringan dapat mengakibatkan penurunan produksi berkisar 30-70%. Selain itu stres kekeringan yang berkelanjutan dapat mengakibatkan kematian sel-sel tumbuhan karena terjadi pemecahan sistem transpor elektron (Zidenga, 2006).

Fase reproduktif kedelai merupakan fase pertumbuhan yang sensitif terhadap stres kekeringan. Stres kekeringan dapat menyebabkan absisi pada bunga serta polong muda sehingga mengurangi jumlah biji yang dihasilkan oleh setiap tumbuhan (Raper dan Kramer, 1987). Selain itu stres kekeringan juga dapat memperpendek masa pembungaan dan mengurangi jumlah bunga sehingga dapat mengurangi jumlah polong dan biji (Kisman, 2003).

Respon tumbuhan terhadap stres kekeringan melibatkan akumulasi senyawa yang dapat melindungi sel dari kerusakan yang terjadi pada potensial air rendah. tumbuhan yang mengalami stres kekeringan secara umum mempunyai ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan tumbuhan normal (Gardner dkk., 1991). Islami dan Utomo (1985) menyatakan bahwa stres kekeringan dapat menyebabkan timbulnya proses fisiologi dan biokimia tumbuhan, seperti penurunan sintesis dinding sel, protein, klorofil, nitrat reduktase, asimilasi karbon dioksida ( $\text{CO}_2$ ) dan respirasi serta peningkatan sintesis asam absisat (ABA). Selain itu juga terjadi penutupan stomata, pengurangan daya hantar xilem, dan terjadinya modifikasi anatomi serta morfologi tumbuhan. Oleh karena itu stres kekeringan mengakibatkan penurunan kemampuan tumbuhan untuk bertahan hidup dan bereproduksi (Fitter dan Hay, 1991).

Adaptasi tumbuhan terhadap stres kekeringan dapat ditunjukkan secara anatomi, seperti penurunan jumlah somata, penebalan dan pepadatan kutikula sehingga kutikula menjadi tidak permeabel terhadap air (Jumin, 1989). Selain itu, juga terjadi adaptasi secara fisiologis meliputi perubahan aktivitas stomata, tekanan osmotik, penurunan transport ion, respirasi, aktivitas enzim, sintesis protein, pengurangan laju fotosintesis dan terjadi akumulasi prolin dan gula

(Fitter dan Hay, 1991).

Hasil penelitian Aji (2005) menunjukkan bahwa pemberian PEG sebagai simulasi stres kekeringan dalam media induksi ES kedelai meningkatkan akumulasi prolin, gula total terlarut dan klorofil pada ES kedelai. Semakin tinggi konsentrasi PEG yang ditambahkan dalam medium mengakibatkan akumulasi prolin, gula total terlarut dan klorofil yang semakin tinggi. Selain itu, Risyati (2005) menjelaskan bahwa penambahan PEG dalam media kultur menghambat pembentukan ES kedelai. Semakin tinggi konsentrasi PEG dalam media maka jumlah ES setiap eksplan semakin sedikit dan persentase penghambatan pembentukan ES sekunder semakin besar.

#### 2.4 Pengaruh Stres Kekeringan terhadap *Reactive Oxygen Species*

Stres kekeringan merupakan salah satu stres abiotik yang disebabkan oleh adanya penurunan potensial air sel. Stres biotik dan abiotik mengakibatkan stres oksidatif. Stres oksidatif adalah efek sekunder dari beberapa jenis stres seperti, serangan patogen ataupun stres kekeringan. Stres oksidatif berawal dari produksi radikal bebas dan reaksi *cascade* (reaksi yang berkelanjutan). Stres oksidatif menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) melalui reaksi peroksidasi lipid. Selain itu, stres oksidatif juga dapat menyebabkan kerusakan protein yang melibatkan modifikasi asam amino spesifik, fragmentasi rantai peptida, perubahan muatan elektrik, dan peningkatan kerentanan terhadap proteolisis (Slater dkk., 2003).

*Reactive oxygen species*, seperti *singlet* oksigen ( $^1\text{O}_2$ ), radikal superoksida ( $\text{O}_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dan radikal hidroksil ( $\text{HO}^\cdot$ ) bersifat sangat reaktif dan menyebabkan kerusakan sel melalui oksidasi protein (Serres dan Mittler, 2007). Menurut Caldentey dan Borz (2002) oksidasi protein dapat merusak protein, membran lipid, dan komponen-komponen sel lainnya. *Reactive oxygen species* dapat mengakibatkan peroksidasi lipid, denaturasi dan *cross-linking* protein dan mutasi DNA (Harinasut dkk., 2003; Serres dan Mittler 2007).

Fungsi utama ROS adalah merespon serangan patogen terhadap tumbuhan (Serres dan Mittler, 2007). *Reactive oxygen species*

berfungsi mengontrol dan meregulasi proses biologis, seperti siklus sel, kematian sel, sinyal hormon, respon stres abiotik maupun biotik, pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan. *Reactive oxygen species* dihasilkan oleh metabolisme aerobik dan kunci regulator pertumbuhan, perkembangan, dan jalur pertahanan tumbuhan (Breusegem, 2007). Menurut Zidenga (2006) secara umum ROS merusak komponen utama sel.

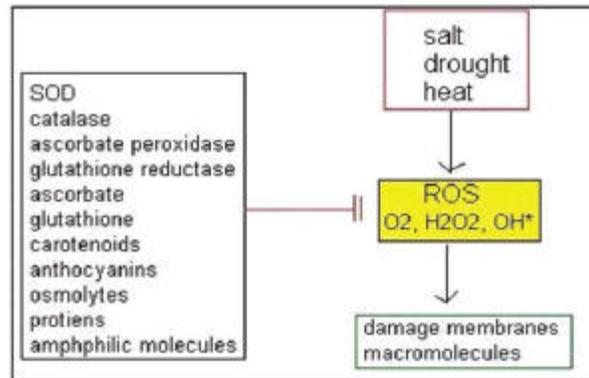
Menurut Serres dan Mittler (2007) dalam kondisi optimal, tumbuhan menghasilkan ROS yang dijadikan sebagai molekul *signaling* terhadap serangan patogen. Zidenga (2006) menjelaskan bahwa ROS merupakan sinyal transduksi utama yang dikaitkan dengan stres kekeringan dan stres lainnya. Stres kekeringan menyebabkan stomata tertutup sehingga terjadi penurunan ketersediaan CO<sub>2</sub>. Hal ini mengakibatkan penurunan energi yang digunakan untuk fiksasi karbon dan menyebabkan terjadinya peningkatan transit energi elektron terhadap oksigen sehingga menghasilkan ROS (Lerner, 1999).

Pada kondisi pertumbuhan optimal, sel menghasilkan O<sub>2</sub><sup>-</sup> sebanyak ±240 μM s<sup>-1</sup> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebanyak 0,5 μM. Kondisi stres lingkungan dapat meningkatkan O<sub>2</sub><sup>-</sup> sebanyak 720 μM s<sup>-1</sup> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebanyak 15 μM (Serres dan Mittler, 2007). Kandungan ROS yang tinggi pada tumbuhan dapat bersifat toksik karena mengganggu homeostasis sel (Defeng Wu dan Cederbaum, 2003). Peningkatan ROS dipengaruhi oleh kondisi kekeringan, salinitas tinggi, *heat shock*, kelebihan logam berat, radiasi UV, stres mekanik, kekurangan nutrisi, serangan patogen, intensitas cahaya tinggi dan polusi udara, seperti ozon dan SO<sub>2</sub> (Serres dan Mittler, 2007), serta herbisida, dan kelebihan air (Harinasut dkk., 2003).

Produksi ROS yang utama terjadi di kloroplas, tetapi juga dihasilkan di mitokondria, peroksisom, dan sitosol (Caldentey dan Borz, 2002). Sumber ROS pada tumbuhan adalah NADPH oksidase, amine oksidase, dan peroksidasi lipid pada dinding sel. Sumber ROS tersebut berkaitan dengan regulasi dan proses pengontrolan pada kematian sel, respon stres, dan serangan patogen (Serres dan Mittler, 2007). Produksi ROS merupakan suatu hasil yang tidak dapat dihindari akibat respirasi aerob. Adanya oksigen pada respirasi aerob dapat bereaksi dengan komponen transpor elektron, jika hanya satu elektron yang dihasilkan maka akan terbentuk radikal superoksida. Pembentukan radikal superoksida terjadi sekitar 1-2% dari konsumsi

oksigen oleh jaringan tumbuhan. Adanya berbagai reaksi menyebabkan radikal superoksida dapat membentuk hidrogen peroksida, radikal hidroksil, dan radikal lainnya (Moller, 2006).

Zidenga (2006) menjelaskan peningkatan ROS pada kondisi stres lingkungan dapat dihambat melalui mekanisme pertahanan sel, seperti peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, askorbat peroksidase, dan lain-lain (Gambar 2.1). Pada kondisi stres, produksi ROS lebih aktif dan dapat berperan sebagai sinyal untuk menginduksi jalur pertahanan sel (Serres dan Mittler, 2007). Stres kekeringan mengakibatkan produksi ROS dalam sel atau organ tumbuhan dengan meningkatkan aktivitas oksidasi metabolisme atau dengan mempertahankan aliran elektron di kloroplas, mitokondria dan mikrobodi (Zidenga, 2006).



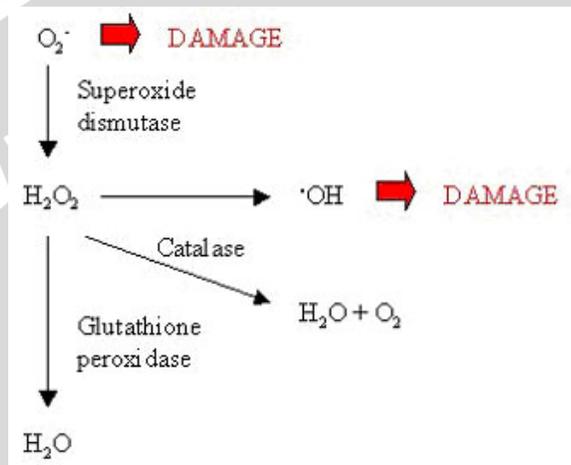
Gambar 2.1 Jalur *Reactive oxygen species* (Zidenga 2006).

## 2.5 Peran Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase terhadap Produksi *Reactive Oxygen Species*

Sel-sel tumbuhan membutuhkan mekanisme untuk meregulasi konsentrasi ROS intraseluler melalui *scavenging* ROS (Serres dan Mittler, 2007). *Scavenging* ROS adalah mekanisme pertahanan tumbuhan terhadap stres kekeringan melalui respon enzimatik (SOD, katalase, peroksidase) dan nonenzimatik (*ascorbat*, *glutathion*, *α-tocopherol*) (Jaleel dkk., 2007). Ekspresi enzim *scavenging* ROS

yang berlebihan akan meningkatkan toleransi tumbuhan terhadap stres abiotik (Serres dan Mittler, 2007).

Hasil penelitian Harinasut dkk. (2003) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim antioksidan pada kultivar Mulberry (*Morus sp.*) dalam kondisi stres garam, karena tumbuhan melakukan mekanisme pertahanan dengan cara meningkatkan aktivitas enzim antioksidan untuk menghancurkan ROS. Oleh karena itu pada kondisi stres lingkungan, terjadi keseimbangan antara produksi ROS dengan peningkatan aktivitas enzim antioksidan. Selain itu produksi ROS dapat diturunkan melalui jalur elektron alternatif dalam rantai transpor elektron pada kloroplas dan mitokondria melalui enzim yang disebut sebagai oksidase alternatif (Serres dan Mittler, 2007).



Gambar 2.2 Aktivitas SOD, katalase, dan peroksidase terhadap ROS (Anonymous, 2006).

Tumbuhan mengandung enzim untuk mendetoksifikasi ROS, yaitu SOD, katalase, dan peroksidase. Superoksida dismutase akan menghancurkan  $O_2^-$  menjadi  $H_2O_2$  dan  $O_2$ , sedangkan katalase dan peroksidase mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $O_2$  dan  $H_2O$  (Gambar 2.2). Ada dua mekanisme untuk menghentikan aktivitas  $H_2O_2$ , yaitu oksidasi hidrogen peroksida dan reduksi zat besi pada tempat yang aktif. Hidrogen peroksida digunakan sebagai reduktan bagi enzim sehingga

menghasilkan oksigen dan air (Anonymous, 2006). Menurut Breusegem (2007) perbedaan mekanisme ROS pada sel tumbuhan dipengaruhi oleh reseptor protein, faktor transkripsi yang sensitif terhadap redoks, dan penghambatan fosfatase secara langsung.

Menurut Ukeda (2002) SOD merupakan salah satu enzim penting untuk pertahanan terhadap stres oksidatif karena dapat mendismutasi  $O_2^-$  yang sangat reaktif. Mekanisme kerja SOD adalah mengkatalisis dua molekul  $O_2^-$  menjadi  $H_2O_2$  dan  $O_2$ . Molekul toksik seperti  $O_2^-$  dan  $HO^-$  dapat ditemukan pada sel yang mengandung oksigen. Molekul toksik dihasilkan dari respirasi aerobik (Anonymous, 2006). Superoksida dismutase mengkatalisis  $O_2^-$  dengan cepat (Defeng Wu dan Cederbaum, 2003). Aktivitas SOD meningkat sebesar 80% karena kondisi stres kekeringan (Rozeck dan Pukacki, 2004). Superoksida dismutase dapat dibedakan menjadi 3 kelompok berdasarkan kofaktor logamnya, yaitu Cu/Zn SOD (terdapat di kloroplas dan sitosol), Fe SOD (terdapat di kloroplas), dan Mn SOD (terdapat di mitokondria dan peroksisom) (Slater dkk., 2003).

Katalase adalah enzim yang ditemukan di membran dan komponen sel, seperti peroksisom. Katalase mendetoksifikasi  $H_2O_2$  dengan cara mengkatalisis dua molekul  $H_2O_2$  menjadi  $O_2$  dan dua molekul  $H_2O$ . Katalase juga dapat meningkatkan interaksi  $H_2O_2$  dengan komponen alkohol, seperti etanol dan metanol yang berperan sebagai donor hidrogen sehingga  $H_2O_2$  dapat diubah menjadi molekul air dan donor hidrogen akan dioksidasi (Defeng Wu dan Cederbaum, 2003).

Setiap molekul katalase dapat memisahkan berjuta molekul  $H_2O_2$  setiap menit. Katalase berbentuk tetramer yang berukuran 60 atau 75 kDa. Setiap subunit mengandung struktur aktif dan stabil, walaupun struktur katalase kaku dan bersifat resisten. Katalase merupakan enzim yang stabil dan lebih resisten terhadap tingkat keasaman, suhu denaturasi dan proteolisis. Beberapa katalase mengandung NADPH sebagai kofaktor yang berfungsi mencegah terbentuknya komponen inaktif (Anonymous, 2006).

Peroksidase merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi sehingga disebut sebagai oksidoreduktase. Peroksidase merupakan oksidoreduktase yang menggunakan  $H_2O_2$  sebagai penerima elektron untuk mengkatalisis reaksi oksidatif yang

berbeda. Peroksidase mereduksi  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi  $\text{H}_2\text{O}$  ketika mengoksidasi berbagai substrat (Anonymous, 2006).

Keseimbangan antara aktivitas katalase, peroksidase dan SOD bertujuan untuk menentukan tingkat kandungan  $\text{O}_2^-$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dalam sel. Keseimbangan tersebut terjadi bersama dengan pemisahan ion logam, seperti Fe dan Cu oleh protein *binding ferritin* dan *copper* yang penting untuk pembentukan toksik tinggi melalui reaksi *dependent* Fenton atau Haber-Weiss terhadap logam (Serres dan Mittler, 2007).



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2008 sampai Maret 2009 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Kultur Jaringan dan Mikroteknik tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak kelompok faktorial yang terdiri dari dua faktor, yaitu: dua varietas kedelai (Dieng, toleran terhadap stres kekeringan dan Burangrang, peka terhadap stres kekeringan), dan empat konsentrasi polietilena glikol (PEG) (0%, 5%, 10%, dan 15%). Setiap perlakuan uji dilakukan dua kali ulangan.

### 3.3 Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini ada dua macam, yaitu: media induksi dan pemeliharaan embrio somatik (ES) serta media perlakuan PEG pada ES kedelai. Media pemeliharaan ES menggunakan makronutrien dan mikronutrien Murashige dan Skoog (1962) yang ditambahkan vitamin B5 (Gamborg dkk., 1968) dan zat pengatur tumbuh NAA dan 2,4 D masing-masing 10 ppm serta gula 15 gram/liter (Lampiran 1 Tabel 1). Media perlakuan PEG adalah media induksi dan pemeliharaan ES yang ditambahkan PEG sesuai konsentrasi yang digunakan.

Media induksi dan pemeliharaan ES dibuat dengan cara membuat larutan stok terlebih dahulu (Lampiran 1 Tabel 2), kemudian larutan stok tersebut diambil secara berurutan satu per satu sesuai dengan komposisi media dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 ml. Vitamin B5, zat pengatur tumbuh NAA dan 2,4 D masing-masing 10 ppm dan gula 15 gram ditambahkan ke media dan dicampur dengan akuades hingga volume mencapai setengah dari volume total, yaitu 500 ml. Media dilhomogenasi dengan menggunakan *magnetic* stirer, dilanjutkan dengan pengaturan nilai pH 5,8 menggunakan pH-meter, jika larutan terlalu asam maka ditambahkan NaOH dan jika larutan terlalu basa maka ditambahkan

HCl. Media ditambah akuades hingga volume media 1000 ml. Media dituangkan ke dalam botol-botol kultur yang telah diberi spon sintetik dan kertas saring. Botol ditutup dengan plastik dan disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, 1 atm selama 10 menit.

Media perlakuan PEG pada ES kedelai dibuat dengan cara yang sama dengan pembuatan media induksi dan pemeliharaan ES. Namun sebelum media induksi dan pemeliharaan ES dihomogenasi, dilakukan penambahan PEG dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% yang masing-masing setara dengan potensial air sebesar -0,03; -0,19; dan -0,41 Mpa (Mexal dkk., 1974), serta media yang tidak ditambahkan PEG (PEG 0%) sebagai media kontrol. Media perlakuan PEG diberi label sesuai konsentrasi PEG yang digunakan, kemudian disterilisasi dengan *autoclave* pada 121°C, 1 atm selama 10 menit.

### **3.4 Induksi dan Pemeliharaan Embrio Somatik Kedelai**

Induksi dan pemeliharaan ES kedelai dilakukan dengan menanam masing-masing ES kedelai varietas Dieng dan Burangrang ke dalam media pemeliharaan ES secara aseptik di *Laminar Air Flow*. Setiap varietas ditanam pada botol media kultur dengan masing-masing botol media kultur berisi 3-5 *clump* ES. Embrio somatik yang telah ditanam dalam botol media kultur, lalu diinkubasi di rak kultur dalam kondisi gelap selama satu bulan pada suhu 24-25°C. Embrio somatik yang tumbuh digunakan sebagai eksplan untuk bahan perlakuan PEG pada ES kedelai.

### **3.5 Perlakuan Uji Pengaruh Stres Kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol pada Embrio Somatik Kedelai**

Perlakuan uji pengaruh stres kekeringan dilakukan dengan mengkultur ES kedelai varietas Dieng dan Burangrang pada media perlakuan PEG dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15%, serta pada media yang tidak mengandung PEG (PEG 0%) sebagai kontrol. Setiap varietas ditanam pada botol media kultur dengan masing-masing botol media kultur berisi lima *clump* ES. Embrio somatik yang telah ditanam dalam botol media kultur diinkubasi di rak kultur dalam kondisi gelap selama satu bulan pada suhu 24-25°C. Hasil perlakuan uji pengaruh stres kekeringan yang disimulasi dengan

PEG pada ES kedelai digunakan untuk analisis pengaruh stres kekeringan terhadap pembentukan ES kedelai dan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan peroksidase pada ES kedelai.

### **3.6 Evaluasi Pengaruh Stres Kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol terhadap Pembentukan Embrio Somatik Kedelai**

Evaluasi pengaruh stres kekeringan terhadap pembentukan ES dilakukan dengan menghitung jumlah ES yang terbentuk setiap eksplan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop binokuler. Selain itu juga dihitung persentase penurunan jumlah ES yang terbentuk setiap eksplan dibandingkan dengan kontrol.

$$\text{Penurunan jumlah ES/eksplan (\%)} = \frac{\Sigma \text{ESo} - \Sigma \text{ESp}}{\Sigma \text{ESp}} \times 100 \%$$

Keterangan :

$\Sigma \text{ESo}$  =Jumlah ES/eksplan pada media kontrol (PEG 0%)

$\Sigma \text{ESp}$  =Jumlah ES/eksplan pada media uji pengaruh stres kekeringan (PEG 5%, 10%, atau 15%)

### **3.7 Evaluasi Pengaruh Stres Kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase pada Embrio Somatik Kedelai**

Evaluasi pengaruh stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai dilakukan dengan menganalisis aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai varietas Dieng dan Burangrang yang dikultur pada media yang mengandung PEG dan pada media yang tidak mengandung PEG (kontrol) umur satu bulan. Sebelum dilakukan analisis aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase, terlebih dahulu dilakukan ekstraksi enzim SOD, katalase, dan peroksidase.

Ekstraksi enzim SOD, katalase, dan peroksidase dilakukan berdasarkan metode Unyayar dan Cekic (2005). Bahan yang digunakan adalah ES berumur 1 bulan yang telah ditanam di media uji pengaruh PEG. Embrio somatik ditimbang sebanyak 0,2 g dan dihomogenasi menggunakan mortar dan pestle dengan

menambahkan 1 ml buffer fosfat ( $\text{PO}_4$ ) 0,1 M pH 6,8 yang mengandung 0,1 mM Natrium Etilen diamin tetra asetat ( $\text{NaEDTA}$ ) dan 20 mg Polyvinyl pirolidone (PVP) (Lampiran 4). Homogenat dimasukkan ke tabung eppendorf dan disentrifugasi pada “Centrifuge 5810 R” dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 20 menit. Supernatan dipindah ke tabung eppendorf baru dan digunakan sebagai bahan analisis aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase.

Aktivitas enzim SOD diukur berdasarkan metode Giannapolitis dan Ries (1977) dalam Panda dkk. (2003). Larutan yang digunakan adalah tris buffer saline (TBS) pH 8,9 sebanyak 2,5 ml, bovine serum albumin (BSA)  $3,3 \times 10^{-3}\%$  w/v sebanyak 0,1 ml, nitroblue tetrazolium (NBT) 6 mM sebanyak 0,1 ml dan riboflavin (600  $\mu\text{M}$  dalam 5 mM KOH) sebanyak 0,1 ml (Lampiran 4). Semua larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan ukuran ketebalan yang sama dan dihomogenasi menggunakan vorteks. Kemudian ditambahkan supernatan hasil ekstraksi enzim SOD, katalase, dan peroksidase sebanyak 0,2 ml, lalu dihomogenasi kembali. Tabung reaksi tersebut dimasukkan ke botol selai yang berisi air sampai batas campuran larutan dalam tabung reaksi terendam oleh air. Botol selai tersebut disinari dengan lampu sebesar 200 watt selama 15 menit. Setelah itu nilai absorbansi campuran larutan tersebut diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 560 nm. Aktivitas SOD diukur dari habisnya NBT yang digunakan oleh enzim tersebut ( $\mu\text{mol}$  /menit g berat basah).

Aktivitas enzim katalase diukur berdasarkan metode Chandlee dan Scandalios (1984) dalam Jaleel dkk. (2007). Larutan yang digunakan adalah 50 mM buffer potasium fosfat pH 7 sebanyak 2,56 ml dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 mM sebanyak 0,04 ml (Lampiran 4). Larutan-larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan supernatan hasil ekstraksi enzim SOD, katalase, dan peroksidase sebanyak 0,04 ml, lalu dihomogenasi menggunakan vorteks. Nilai absorbansi campuran larutan tersebut diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 240 nm. Aktivitas katalase diukur dari habisnya  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang digunakan oleh enzim tersebut ( $\mu\text{mol}$  /menit g berat basah).

Aktivitas peroksidase diukur berdasarkan metode Chance dan

Maehly (1955) dalam Panda dkk. (2003). Larutan yang digunakan adalah buffer fosfat 0,1 M pH 6,8 sebanyak 2,1 ml, guaiacol 1,6% sebanyak 0,3 ml dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,04 M sebanyak 0,3 ml (Lampiran 4). Semua larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan supernatan hasil ekstraksi enzim SOD, katalase, dan peroksidase sebanyak 0,3 ml, lalu dihomogenasi menggunakan vorteks. Nilai absorbansi campuran larutan tersebut diukur 1 menit setelah supernatan ditambahkan. Pengukuran nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 470 nm. Aktivitas peroksidase diukur dari habisnya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang digunakan oleh enzim tersebut ( $\mu\text{mol /menit g berat basah}$ ).

### 3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian, dianalisis secara statistika menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan paket program SPSS for Windows Release 12. Apabila terdapat perbedaan nyata, maka dilakukan uji lebih lanjut menggunakan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) pada selang kepercayaan 95 % ( $\alpha=0,05$ ).



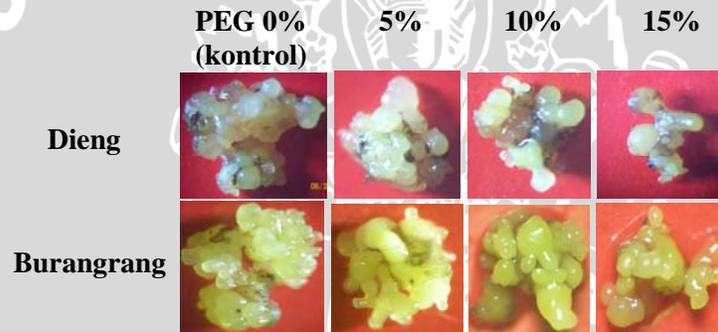
**BAB IV**



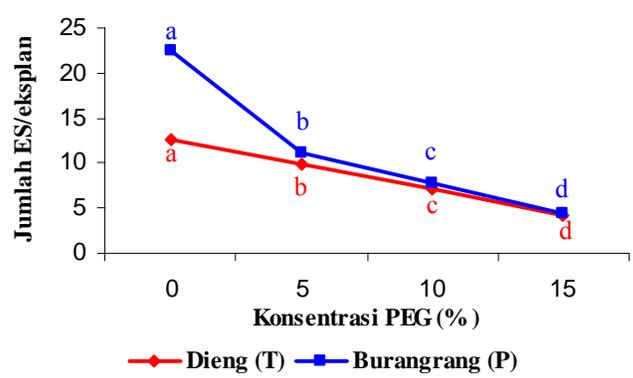
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Respon Pembentukan Embrio Somatik Kedelai pada Media yang Mengandung Polietilena Glikol

Embrio somatik (ES) kedelai yang dikultur pada media yang mengandung polietilena glikol (PEG) memberikan respon yang berbeda dengan ES kedelai yang dikultur pada media yang tidak mengandung PEG (PEG 0%). Embrio somatik kedelai yang terbentuk pada media yang mengandung PEG lebih sedikit dibandingkan dengan ES kedelai yang terbentuk pada media yang tidak mengandung PEG (Gambar 4.1). Jumlah ES kedelai yang terbentuk pada setiap eksplan baik varietas toleran ataupun peka menurun secara nyata pada media yang mengandung PEG (Gambar 4.2). Jumlah ES yang terbentuk pada media yang tidak mengandung PEG pada ES kedelai varietas toleran sebanyak 13 ES/eksplan, sedangkan pada varietas peka sebanyak 22 ES/eksplan. Penurunan jumlah ES pada varietas toleran pada konsentrasi PEG 5% sebanyak 3 ES/eksplan dan pada varietas peka sebanyak 11 ES/eksplan. Peningkatan konsentrasi PEG (10% dan 15%) juga mengakibatkan penurunan jumlah ES yang terbentuk, sehingga semakin tinggi konsentrasi PEG maka semakin sedikit jumlah ES kedelai yang terbentuk.



Gambar 4.1. Embrio somatik kedelai varietas Dieng (toleran) dan Burangrang (peka) yang terbentuk pada media yang mengandung PEG

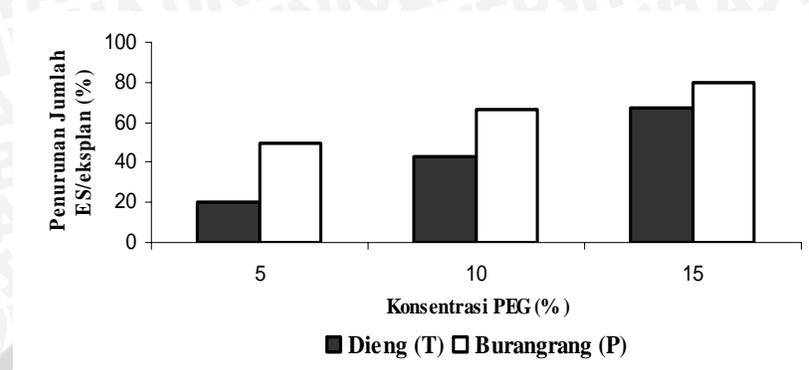


Gambar 4.2 Respon pembentukan ES kedelai varietas Dieng (toleran) dan Burangrang (peka) pada media yang mengandung PEG. Keterangan: Huruf yang berbeda pada masing-masing varietas menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ )

Penurunan jumlah ES kedelai yang terbentuk setiap eksplan pada varietas toleran berbeda dengan varietas peka. Persentase penurunan jumlah ES kedelai pada varietas toleran lebih kecil dibandingkan dengan varietas peka pada media yang mengandung PEG. Persentase penurunan jumlah ES kedelai varietas toleran yang terbentuk pada konsentrasi PEG 5% sebesar 20%, namun pada varietas peka telah mencapai 50% dibandingkan dengan media yang tidak mengandung PEG (kontrol). Penurunan jumlah ES kedelai varietas toleran yang terbentuk pada konsentrasi PEG 10% dan 15% berturut-turut sebesar 43% dan 67%, sedangkan varietas peka sebesar 66% dan 80% (Gambar 4.3).

Stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG menghambat pembentukan ES kedelai. Hal tersebut diduga disebabkan oleh penurunan tekanan turgor dan potensial osmotik intraseluler karena adanya senyawa PEG yang dapat mengikat air sehingga menghambat metabolisme sel. Menurut Mexal dkk. (1974) senyawa PEG merupakan senyawa yang dapat menurunkan potensial osmotik larutan melalui aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang dapat mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen. Menurut Iraki dkk.

(1989) dalam Korbes dan Droste (2005) perubahan tekanan osmotik menyebabkan ukuran embrio menjadi kecil dan penurunan rasio selulosa dengan hemiselulosa dalam dinding sel, sehingga mengakibatkan penurunan elastisitas dinding sel dan penurunan kemampuan dalam pemanjangan sel.



Gambar 4.3 Persentase penurunan pembentukan ES kedelai varietas Dieng (toleran) dan Burangrang (peka) pada media yang mengandung PEG dibandingkan dengan kontrol

Menurut penelitian Kong dkk. (1998) penambahan senyawa PEG pada media kultur *Picea glauca* menyebabkan penurunan kandungan poliamina endogen sehingga terjadi penurunan proliferasi sel. Poliamina diduga terlibat dalam proses pembelahan sel dan morfogenesis, dimana kedua proses tersebut berperan penting dalam induksi embriogenesis somatik. Berdasarkan hal tersebut, maka diduga bahwa penurunan pembentukan ES kedelai dalam kondisi stres kekeringan juga disebabkan oleh adanya penurunan kandungan poliamina endogen. Hasil penelitian Risyati (2005), Wardiani (2005), dan Husni dkk. (2004) menunjukkan bahwa penambahan PEG dalam media kultur menghambat pembentukan ES kedelai. Semakin tinggi konsentrasi PEG dalam media maka jumlah ES/eksplan semakin sedikit dan persentase penghambatan pembentukan ES kedelai semakin besar.

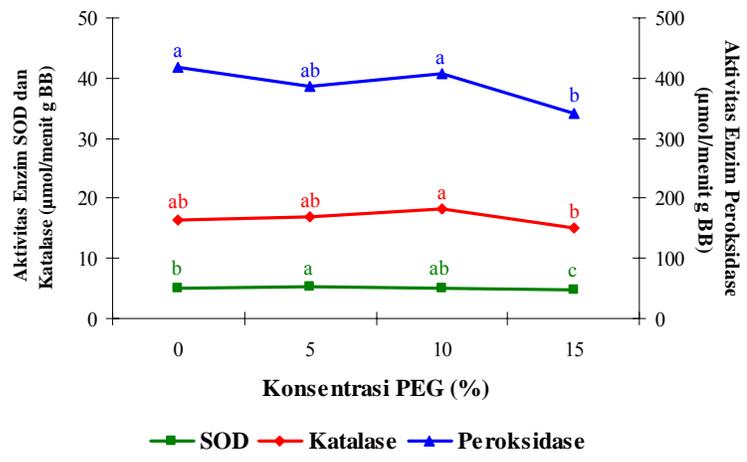
Perbedaan respon pembentukan ES kedelai pada varietas toleran dan peka dalam kondisi stres kekeringan diduga dipengaruhi oleh perbedaan tingkat toleransi dan kemampuan adaptasi terhadap stres kekeringan. Menurut Bonacin dkk. (2000) perbedaan tingkat

repository.ub.ac

toleransi terhadap stres lingkungan dipengaruhi oleh faktor genetik dan kandungan hormon endogen dalam tumbuhan. Selain itu pengaruh perbedaan varietas terhadap pembentukan ES mengindikasikan adanya perbedaan kompetensi regenerasi atau kondisi fisiologis (Lippmann dan Lippmann, 1993). Kompetensi regenerasi dibutuhkan dalam merespon signal embriogenik dan memulai embriogenesis (Parrot dkk., 1988). Menurut Filter dan Hay (1991) adaptasi secara fisiologis terhadap stres kekeringan meliputi perubahan aktivitas stomata, penyesuaian osmotik, penurunan transpor ion, respirasi, aktivitas enzim, sintesis protein, pengurangan laju fotosintesis dan terjadi akumulasi prolin dan gula. Varietas kedelai yang berbeda mempunyai adaptasi yang berbeda terhadap stres kekeringan. Hasil penelitian Aji (2005) menunjukkan bahwa kandungan prolin pada ES kedelai varietas toleran semakin meningkat seiring dengan peningkatan stres kekeringan, sedangkan varietas peka hanya mengalami fluktuasi.

#### **4.2 Pengaruh Stres Kekeringan yang Disimulasi dengan Polietilena Glikol terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase pada Embrio Somatik Kedelai**

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG berpengaruh terhadap aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan peroksidase pada ES kedelai. Stres kekeringan tersebut menyebabkan kecenderungan peningkatan aktivitas enzim SOD dan katalase serta penurunan aktivitas enzim peroksidase. Aktivitas enzim katalase dan SOD cenderung meningkat sampai pada konsentrasi PEG 10% tetapi menurun pada konsentrasi PEG 15%. Konsentrasi PEG 15% juga menurunkan secara nyata aktivitas enzim peroksidase dibandingkan dengan konsentrasi PEG 10%. Aktivitas enzim peroksidase baik dalam kondisi stres dan non-stres kekeringan lebih tinggi daripada aktivitas enzim SOD dan katalase. Aktivitas enzim peroksidase berkisar antara 340-420  $\mu\text{mol}/\text{menit g BB}$ , sedangkan aktivitas enzim katalase dan SOD berkisar antara 4-18  $\mu\text{mol}/\text{menit g BB}$  (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Pengaruh stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai. Keterangan: Huruf yang berbeda pada masing-masing enzim menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ )

Perubahan aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase menunjukkan terjadinya mekanisme pertahanan terhadap stres kekeringan yang dapat menginduksi kerusakan sel melalui peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS). Menurut Lerner (1999) stres kekeringan menyebabkan penutupan stomata sehingga mengakibatkan ketersediaan CO<sub>2</sub> menjadi menurun. Hal ini menyebabkan penurunan energi yang dibutuhkan untuk fiksasi karbon, sehingga pengangkutan elektron untuk oksigen meningkat. Dengan demikian terjadi peningkatan produksi ROS seperti, *singlet* oksigen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), radikal superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dan radikal hidroksil (HO<sup>-</sup>) (Slater dkk., 2003). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan peningkatan aktivitas enzim SOD dalam kondisi stres garam pada *Barley* (*Hordeum vulgare* L.) (Demiral dkk., 2005) dan peningkatan aktivitas enzim katalase pada tomat dalam kondisi stres kekeringan (Unyanyar dan Cekic, 2004). Selain itu terjadi penurunan aktivitas enzim peroksidase pada Jagung dalam kondisi stres kekeringan (Li-ping dkk., 2006) dan pada *Chataranthus*

*roseus* dalam kondisi stres garam (Jallel dkk., 2007).

Peningkatan jumlah  $O_2^-$  dapat distabilkan oleh aktivitas enzim SOD. Menurut Alves da Costa dkk. (2005) aktivitas enzim SOD dapat mendismutasi  $O_2^-$  menjadi  $H_2O_2$  dan  $O_2$ . Peningkatan  $H_2O_2$  dapat didetoksifikasi oleh aktivitas enzim katalase dan peroksidase. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dalam kondisi stres kekeringan cenderung terjadi peningkatan aktivitas enzim katalase, namun sebaliknya pada aktivitas enzim peroksidase. Oleh karena itu diduga bahwa aktivitas enzim katalase dalam kondisi stres kekeringan pada ES kedelai lebih berperan dalam mengubah  $H_2O_2$  dibandingkan enzim peroksidase. Menurut Scebba dkk. (1998) enzim katalase dan peroksidase mampu mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ .

Kondisi stres kekeringan yang tinggi dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase yang diduga karena adanya peningkatan ROS yang sangat besar sehingga tidak sebanding dengan kemampuan aktivitas enzim tersebut. Konsentrasi ROS yang sangat tinggi akan bersifat toksik yang berbahaya bagi sel karena dapat merusak sel (Slater dkk., 2003). Hasil penelitian Li-ping dkk. (2006) menunjukkan penurunan aktivitas enzim SOD, katalase dan peroksidase pada tingkat stres kekeringan yang tinggi pada Jagung menyebabkan besarnya peroksidase lipid pada membran. Menurut Cavalcanti dkk. (2004) kemampuan bertahan hidup tanaman *Cowpea* di bawah kondisi stres garam tinggi tidak disebabkan oleh mekanisme pertahanan melalui aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase karena di bawah kondisi stres garam yang tinggi terjadi penurunan aktivitas enzim tersebut.

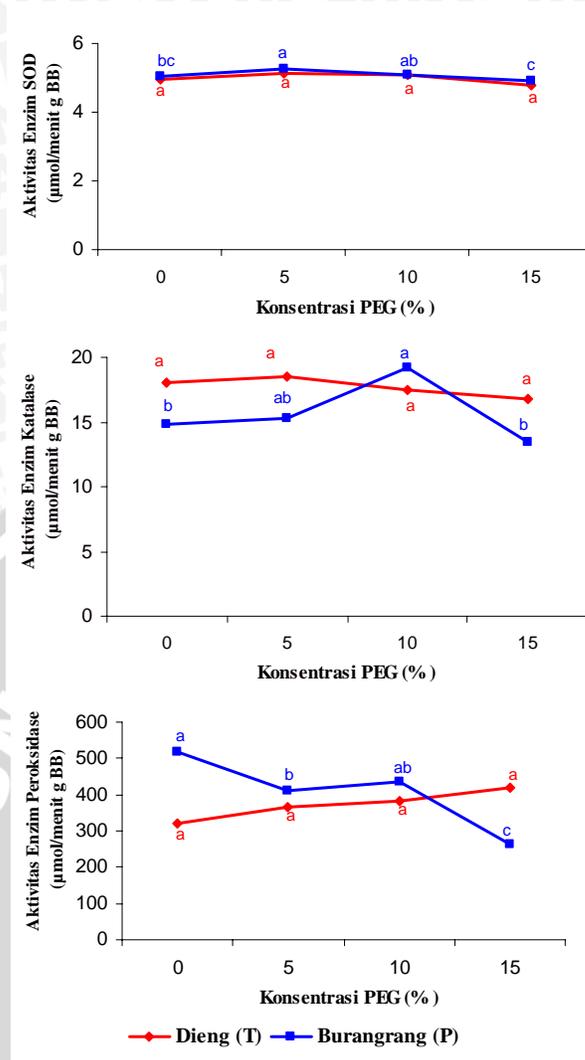
#### **4.3 Hubungan Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase pada Embrio Somatik Kedelai Varietas Toleran dan Peka pada Media yang Mengandung Polietilena Glikol dengan Tingkat Toleransi Kedelai terhadap Stres Kekeringan**

Perubahan aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai yang dikultur pada media yang mengandung PEG bervariasi diantara varietas kedelai. Aktivitas enzim SOD baik pada ES kedelai varietas toleran ataupun peka cenderung menunjukkan peningkatan pada media yang mengandung PEG dibandingkan

dengan media yang tidak mengandung PEG. Peningkatan tersebut terjadi sampai pada konsentrasi PEG 10% sedangkan pada konsentrasi PEG 15% terjadi penurunan. Aktivitas enzim SOD pada ES kedelai varietas toleran tidak berbeda nyata, tetapi pada varietas peka berbeda nyata pada semua perlakuan, meskipun aktivitas enzim SOD pada kedua varietas kedelai tersebut hampir sama, yaitu berkisar antara 4,8-5,2  $\mu\text{mol}/\text{menit g BB}$  (Gambar 4.5).

Embrio somatik kedelai varietas toleran pada media yang mengandung PEG menunjukkan kecenderungan penurunan aktivitas enzim katalase seiring dengan peningkatan konsentrasi PEG, walaupun tidak berbeda nyata diantara semua perlakuan (Lampiran 6). Aktivitas enzim katalase pada ES kedelai varietas peka cenderung meningkat sampai konsentrasi PEG 10%. Pada konsentrasi PEG 10%, aktivitas enzim katalase pada ES kedelai varietas peka sebesar 19,1  $\mu\text{mol}/\text{menit g BB}$ . Akan tetapi aktivitas enzim katalase terjadi penurunan secara nyata pada konsentrasi PEG 15% sebesar 30% menjadi 13,4  $\mu\text{mol}/\text{menit g BB}$  dibandingkan dengan konsentrasi PEG 10%. Aktivitas enzim katalase pada ES kedelai varietas peka pada semua perlakuan lebih rendah dibandingkan varietas toleran, kecuali pada konsentrasi PEG 10% (Gambar 4.5).

Aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas toleran pada media yang mengandung PEG cenderung mengalami peningkatan. Persentase peningkatan aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas toleran mencapai 31% dibandingkan dengan media yang tidak mengandung PEG, tetapi peningkatan tersebut tidak berbeda nyata diantara semua perlakuan. Namun sebaliknya pada ES kedelai varietas peka menunjukkan penurunan aktivitas enzim peroksidase secara nyata. Aktivitas enzim peroksidase pada media yang tidak mengandung PEG sebesar 518  $\mu\text{mol}/\text{menit g BB}$  dan pada konsentrasi PEG 15% dapat menurunkan aktivitas enzim tersebut sebesar 49% sehingga menjadi 265  $\mu\text{mol}/\text{menit g BB}$  (Gambar 4.5).



Gambar 4.5 Pengaruh PEG terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai varietas Dieng (toleran) dan Burangrang (peka). Keterangan: Huruf yang berbeda pada masing-masing varietas kedelai menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ )

Perbedaan aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase pada ES kedelai varietas toleran dan peka di bawah kondisi stres kekeringan mengindikasikan bahwa ada hubungan antara aktivitas enzim tersebut dengan tingkat toleransi kedelai terhadap stres kekeringan sehingga dapat dijadikan indikator tingkat toleransi terhadap stres kekeringan. Hal ini disebabkan perbedaan mekanisme pertahanan sel terhadap stres kekeringan pada masing-masing varietas melalui perubahan aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase. Menurut Unyayar dkk. (2005) peningkatan aktivitas enzim antioksidan pada tomat varietas toleran dan penurunan aktivitas enzim antioksidan pada tomat varietas peka dalam kondisi stres kekeringan menunjukkan adanya korelasi positif antara aktivitas enzim antioksidan dengan tingkat toleransi terhadap stres kekeringan.

Terjadi perubahan aktivitas enzim SOD yang sama pada kondisi stres kekeringan pada ES kedelai varietas toleran dan peka. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas enzim SOD pada ES kedelai varietas toleran ataupun peka kurang berperan dalam mekanisme toleransi ES kedelai terhadap stres kekeringan dan untuk bertahan hidup terhadap peningkatan jumlah  $O_2^-$  dalam kondisi stres kekeringan. Adanya aktivitas enzim SOD yang sama antara ES kedelai toleran dan peka tersebut maka diduga bahwa tidak ada hubungan antara aktivitas enzim SOD pada ES kedelai dengan tingkat toleransi kedelai terhadap stres kekeringan. Kemungkinan yang lebih berperan dalam mendetoksifikasi peningkatan  $O_2^-$  pada ES kedelai varietas toleran di bawah kondisi stres kekeringan adalah non-enzim antioksidan, seperti *ascorbat* dan *gluthation*. Menurut Jaleel dkk. (2007) radikal superoksida dapat didetoksifikasi oleh *ascorbat* atau *gluthation* menjadi  $H_2O_2$  dan  $O_2$  dalam kondisi stres lingkungan.

Hasil penelitian Moussa dan Abdel-Aziz (2008) menunjukkan bahwa aktivitas enzim SOD meningkat seiring dengan peningkatan stres kekeringan pada jagung varietas toleran ataupun peka kekeringan. Aktivitas enzim SOD dalam kondisi stres kekeringan pada *Poa pretensis* L. varietas toleran lebih tinggi dibandingkan dengan varietas peka (Wang dan Huang, 2004).

Embrio somatik kedelai varietas toleran di bawah kondisi stres kekeringan menunjukkan tidak ada perubahan aktivitas enzim katalase seiring dengan semakin tingginya tingkat stres kekeringan.

Menurut Criszar dkk. (2007) varietas toleran mampu bertahan hidup dalam kondisi stres lingkungan karena dapat melawan kerusakan sel antara lain dengan cara meningkatkan aktivitas enzim antioksidan. Selain itu varietas toleran juga mempunyai adaptasi yang baik dalam menghadapi kondisi stres kekeringan.

Adanya perbedaan perubahan aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas toleran dan peka dalam kondisi stres kekeringan yang disimulasi dengan PEG yang ditunjukkan dengan adanya kecenderungan peningkatan aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas toleran seiring dengan semakin tingginya tingkat stres kekeringan dan sebaliknya pada ES kedelai varietas peka yang menunjukkan penurunan aktivitas enzim peroksidase seiring dengan semakin tingginya tingkat stres kekeringan. Dengan demikian diduga bahwa aktivitas enzim peroksidase dapat dihubungkan dengan tingkat toleransi kedelai terhadap stres kekeringan, sehingga aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai dapat digunakan sebagai indikator tingkat toleransi kedelai terhadap stres kekeringan. Aktivitas enzim peroksidase berkorelasi positif terhadap stres kekeringan pada kedua kultivar jagung (Mohammadkahani dan Heidari, 2007).



## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Stres kekeringan yang disimulasi dengan polietilena glikol berpengaruh terhadap respon pembentukan embrio somatik (ES) kedelai dan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan peroksidase pada ES kedelai. Polietilena glikol menghambat pembentukan ES kedelai, semakin besar konsentrasi PEG maka semakin besar penghambatan pembentukan ES kedelai. Pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim SOD, katalase, dan peroksidase tergantung pada tingkat toleransi varietas kedelai yang diuji.

Di bawah kondisi stres kekeringan terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas toleran dan penurunan aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas peka. Aktivitas enzim katalase di bawah kondisi stres kekeringan pada ES kedelai varietas peka cenderung meningkat, tetapi pada varietas toleran tidak begitu terjadi perubahan. Sedangkan aktivitas enzim SOD di bawah kondisi stres kekeringan pada ES kedelai varietas toleran tidak ada perbedaan perubahan dibandingkan dengan varietas peka.

### 5.2 Saran

Pada penelitian ini tidak ada perbedaan perubahan aktivitas enzim SOD di bawah kondisi stres kekeringan pada ES kedelai varietas toleran dan peka, hal ini menunjukkan enzim SOD kurang berperan dalam mekanisme toleransi ES kedelai terhadap stres kekeringan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang kandungan non-enzim antioksidan yang berperan sama dengan enzim SOD, seperti *ascorbat* dan *gluthation* pada ES kedelai dalam kondisi stres kekeringan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahlowalia, B.S. 1986. Limitations to The Use of Somaclonal Variation in Crop Improvement. *dalam* J. Semal (Ed.). Somaclonal Variation and Crop Improvement. Martinus Nijhoff Publisher. New York. Hal. 14-27.
- Aji, L.P. 2005. Karakterisasi Fisiologi untuk Toleransi terhadap Stres kekeringan pada Embrio Somatik Kedelai. Skripsi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Alves da Costa, P.H., A.D.D. Neto, M.A. Bezerra, J.T. Prisco, dan E. Gomes-Filho. 2005. Antioxidant-Enzymatic System of Two Sorghum Genotypes Differing in Salt Tolerance. *Braz. J. Plant. Physiol.* 17(4):353-361.
- Anonymous. 2006. Antioxidant. <http://www.enzymeindia.com/enzymes/antioxidant.asp>. Tanggal akses 12 Desember 2007
- Barwale, U.B. dan J.M. Widholm. 1990. Soybean: Plant Regeneration and Somaclonal Variation. *Dalam* Y.P.S. Bajaj (Ed.). Biotechnology in Agricultural and Forestry, Vol. 10. Legumes and Oilseed Crops 1. Springer Verlag. Berlin. Hal 114-116.
- Blum, A. 1988. Use of PEG to Induce and Control Plant Water Deficit in Experimental Hydroponics' Culture. <http://www.plantstress.com/admin/Files/PEG.htm>. Tanggal akses 20 September 2007.
- Bonacin, G.A, A.O. Di Mouro., R.C. de Olivera dan D. Percin. 2000. Induction of Somatic Embryogenesis in Soybean:Physiochemical Factors Influencing The development of Somatic Embryos. *Genet. Mol. Biol.* 23:865-868.
- BPS. 2007. Produksi Padi, Jagung, dan Kedelai Tahun 2005-2007. [http://www.bps.go.id/releases/Production\\_Of\\_Paddy\\_Ma](http://www.bps.go.id/releases/Production_Of_Paddy_Ma)

ize\_And\_Soybeans/Bahasa\_Indonesia/more2.html.  
Tanggal akses 14 Februari 2008.

Breusegem, F.V. 2007. Reactive Oxygen Species in Plant.  
[http://topics.scirus.com/Reactive\\_Oxygen\\_Species\\_in\\_Plants.html](http://topics.scirus.com/Reactive_Oxygen_Species_in_Plants.html). Tanggal akses 12 Desember 2007.

Caldentey, K.M.O. dan W.H. Barz. 2002. Plant Biotechnology and Transgenic Plants. Matcell Dekker, Inc. New York. Hal 636-641.

Cavalcanti, F.R., J.T.A. Oliveira, A.S. Martins-Miranda, R.A. Viegas, dan J.A.G. Silveira. 2004. Superoxide Sismutase, Catalase, and Peroxidase Acivities do not Confer Protection Against Oxidative Damage in Salt-Stressed Cowpea Leaves. *New Physiologist*. 163:563-571.

Criszar, J., E. Lantos, I. Tari, E. Madosa, B. Wodala, A. Vashegyi, F. Horvath, A. Pecsvaradi, M. Szabo, B. Bartha, A. Galle, A. Lazar, G. Coradini, M. Staicu, S. Postelnicu, S. Mihacea, G. Nedela, dan L. Erdei. 2007. Antioxidant Enzyme Activities in *Allium* species and Their Cultivars Under Water Stress. *Plant Soil. Environ.* 53(12):517-523.

Dami, I. dan H. Hughes. 1997. Effects of PEG-Indicated Water Stress on *In Vitro* Hardening of "Valiant" Grope. *Plant Cell, Tiss., and Org. Cult.* 47:97-101.

Defeng Wu dan A.I. Cederbaum. 2003. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. <http://findarticles.com/p/articles/mi-m0cxh/is-4-27/>. Tanggal akses 12 Desember 2007

Demiral, M.A., M. Aydin, dan A. Yorulmaz. 2005. Effect of Salinity on Growth Chemical Composition and Antioxidant Enzume Activity of Two Malting Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars. *Turk.J.Biol.* 29:117-123.

Evans, D.E., J.O.D. Coleman dan A. Kearns. 2003. Plant Cell Tissue Culture. Bios Scientific Publishers. London. Hal 142.

- Fitter, A.H. dan R.K.M. Hay. 1991. Fisiologi Lingkungan Tumbuhan. Penerjemah: Andani S. dan Purbayanti E.D. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller dan K. Ojima. 1968. Nutrient Requirement of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce dan R.L. Mitchell. 1991. Fisiologi Tumbuhan Budidaya. Cetakan ke-1. Penerjemah: H. Susilo. UI Press. Jakarta.
- Harinasut, P., D. Poonsopa, K. Roengmongkol, dan R. Charoensatapom. 2003. Salinity Effect on Antioxidant Enzymes in *Mulberry* Cultivar. *Science Asia* 29:109-113.
- Husni, A., S. Hutami, M. Kosmiatin, dan I. Mariska. 2004. Regenerasi Massa Sel Embriogenik Kedelai yang Diseleksi dengan Polyethylen Glikol 6000 (PEG). *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tumbuhan*. Bogor. Hal. 272-280.
- Hutami, S., I. Mariska, dan Y. Supriati. 2006. Peningkatan Keragaman Genetik Tumbuhan melalui Keragaman Somaklonal. *Jurnal AgroBiogen* 2:81-88.
- Islami, T dan W.H. Utomo. 1985. Hubungan Tanah, Air dan Tumbuhan. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Jaleel, C.A., R. Gopi, P. Manivannan, dan R. Panneerselvam. 2007. Antioxidative Potentials as a Protective Mechanism in *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. Plants Under Salinity Stress. *Turk J Bot* 31: 245-251.
- Jumin, H.B. 1989. Ekologi Tumbuhan: Suatu Pendekatan Fisiologi. Edisi Pertama. Cetakan Kedua. Rajawali Press. Jakarta.
- Kisman. 2003. Effect of Drought Stress on Growth and Yield of Soybean.

[http://rudyc2.250x.com/sem1\\_012?u\\_kisman.htm](http://rudyc2.250x.com/sem1_012?u_kisman.htm).  
Makalah Falsafah Sains Program Pasca Sarjana S3. Institut  
Pertanian Bogor. Tanggal akses 10 November 2007.

Kong, L., S.M. Atree dan L.C. Fowke. 1998. Effect of Polyethylene Glycol and Methylglyoxal bis (guanylhydrazone) on Endogenous Polyamine Levels and Somatic Embryo Maturatin in White Spruce (*Picea glauca*). *Plant Science* 133:211-220.

Korbes, A.P. dan A. Droste. 2005. Carbon Sources and Polyethylene Glikol on Soybean Somatic Embryo Conversion. *Brasilia* 40:211-216.

Lerner, H.R. 1999. Plant Responses to Environmental Stresses. Marcel Pekter, Inc. New York. Hal. 254-256.

Li-ping, BAI., BAI Fang-Gong., GE Ti-Da., SUN Zhao-Hui., LU Yin-Yan., dan Zhou Guang-Sheng. 2006. Effect of Soil Drought Stress on Leaf Water Status, Membrane Permeability and Enzymatic Antioxidant System of Maize. *Pedosphere* 16(3):326-332.

Lippmann, B dan G. Lippmann. 1993. Soybean Embryo Culture: Factors Influencing plant Recovery from Isolated Embryos. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 32:83-90.

Mariska, I. 2002. Perkembangan Penelitian Kultur *In Vitro* pada Tumbuhan Industri, Pangan, dan Hortikultura. *Buletin AgroBio* 5:45-50.

Merkle, S.A., W.A. Parrot dan E.G. William. 1990. Application of Somatic Embryogenesis and Embryo Cloning. *dalam* S.S. Bhojwani (Ed.). *Plant Tissue Culture: Application and Limitation*. Elsevier Science ltd. Oxford. Hal. 67-101.

Mexal, J., J.T. Fisher, J. Osteryoung dan C.P.P. Reid. 1974. Oxygen Availability in Polyethylene Glikol Solutions and Its Implications in Plant-Water Relation. *Plant Physiol.* 55:20-24.

- Mohammadkhani, N. dan R. Heidari. 2007. Effects of Drought Stress on Protective Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Two Maize Cultivars. *Pakistan J. Biol. Sci.* 10(21):3835-3840.
- Moller, I.M. 2006. *Reactive Oxygen Species (ROS) and Plant Respiration*. <http://4e.plantphys.net/article.php>. Tanggal akses 12 Desember 2007.
- Moussa, H.R. dan S.M. Abdel-Aziz. 2008. Comparative Response of Drought Sensitive Maize Genotypes to Water Stress. *Australian J. Crop Sci.* 1(1):31-36.
- Murashige, T. dan F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture. *Plant Physiol.* 15: 473-497.
- Palmer, J., E.J. Dunphy dan P. Reese. 1996. Managing Drought-Stressed Soybeans in The Southeast. <http://www.clemson.edu/psapublishing/PAGE/AGRO/SL11.pdf>. Tanggal akses 10 Mei 2004.
- Panda, S.K., L.B. Singha dan M.H. Khan. 2003. Does Aluminium Phytotoxicity Induce Oxidative Stress in Greengram (*Vigna radiata*). *Plant Physiol.* 29(1-2):77-86.
- Pardal, S.J., T.I.R. Utami, dan M. Herman. 2004. Organogenesis dan Embryogenesis Somatik Kedelai secara *In Vitro*. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tumbuhan*. Bogor. Hal. 28-36.
- Parrot, W.A., E.G. Williams, D.F. Hildebrand dan G.P. Collins. 1988. Effect of Genotype on Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean. *Plant Cell Physiol.* 24:19-21.
- Pinhero, R.F., M.V. Rao, G. Paliyath, D.P. Murr, dan R.A. Fletcher. 1997. Changes in Activities of Antioxidant Enzymes and Their Relationship to Genetic and Paclobutrazol-Induced Chilling Tolerance of Maize Seedling. *Plant Physiol.* 114:695-704.

- Pitoyo, S. 2003. Benih Kedelai. Kanisius. Yogyakarta. Hal 5-7.
- Raper, C.D. dan P.J. Kramer. 1987. Stress Physiology. *Dalam* J.R. Wilcoz (Ed). Soybean: Production and Uses. Edisi Kedua American Society of Agronomy, Inc. New York. Hal. 589-623.
- Risyiati, D. 2005. Tingkat Toleransi terhadap Cekaman Kekeringan Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) Berdaya Hasil Tinggi Berdasarkan Respon Pembentukan Embrio Somatik pada Media yang Mengandung Polietilena Glikol. Skripsi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Rozek, K., E. dan P.M. Pukacki. 2004. Effect of Water Deficit on Oxidative Stress and Degredation of Cell Membrane in Needle of Norway Spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.* 26:4431-442.
- Scebba, F., L. Sebastian, dan C. Vitagliano. 1998. Changes in Activity of Antioxidant Enzymes in Wheat (*Triticum aestivum*) Seedling Under Cold Acclimation. *Physiol. Plant.* 104:747-752.
- Serres, J.B. dan R.Mittler. 2007. The Role of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/141/2/311>. Tanggal akses 27 Desember 2007.
- Short, K.C., I. Warburton, dan A.V. Roberts. 1987. *In Vitro* Hardening of Cultures Cauliflower and Chrysanthemum Plantlets to Humidity. *Acta Hort.* 2120:324-329.
- Siagian, N. 2003. Swasembada Kedelai dan Jagung Masih Sebatas Mimpi. <http://www.sinarharapan.co.id/ekonomi/industri/2003/1015/ind1.html>. Tanggal akses 13 Desember 2007.
- Slater, A., N. Scott, dan M. Fowler. 2003. Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plant. Oxford University Press, Inc. New York.

- Suharjawanasuria. 2001. Produksi Kedelai Nasional Belum Mencukupi. [http://agribisnis.tripod.com/bahan\\_baku\\_0.2.htm](http://agribisnis.tripod.com/bahan_baku_0.2.htm). Tanggal akses 13 Desember 2007.
- Suhartina. 2003. Perkembangan dan Deskripsi Varietas Unggul Kedelai 1918-2003. Balitkabi. Malang. Hal. 72.
- Ukeda. H. 2002. Assay of Enzyme Superoxide Dismutase (SOD). <http://www.dojindo.com/newsletter/review-vol3-3.html>. Tanggal akses 12 desember 2007.
- Unyayar, S. dan F.C. Cekic. 2004. Change in Antioxidant Enzymes of Young and Mature Leaves of Tomato Seedling Under Drought. *Turk J Biol* 29:211-216.
- Unyayar, S., Y. Keles, dan F.C. Cekic. 2005. The Oxidative Response of Two Tomato Species with Different Drought Tolerance as a Result of Drought and Cadmium Stress Combination. *Plant Soil Environ.* 2:27-64.
- Wang, Z. dan B. Huang. 2004. Physiological Recovery of Kentucky Bluegrass from Simultaneous Drought ang Heat Stress. *Crop Sci.* 44:1729-1736.
- Wanodyatama. 2004. Buletin Wanodyatama Edisi 1 Tahun VIII- 8 Januari 2004. Paguyuban Ibu-Ibu Keluarga Besar Persero. Surabaya.
- Wardiani, R.D. 2005. Skrining *In Vitro* untuk Toleransi terhadap Cekaman Kekeringan dengan Menggunakan Polietilena Glikol pada Varietas Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) Berdaya Hasil Rendah. Skripsi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Wardiyono. 2007. *Glycine max* Merr. <http://www.kehati.or.id/prohati/browser.php?docsid=198>. Tanggal akses 3 Desember 2007.

Wattimena, G.A. 1992. Bioteknologi Tumbuhan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. Hal. 308.

Zidenga, T. 2006. Progres on Molecular Approaches to Drought Tolerance in Crop Plants. <http://www.isb.vt.edu/articles/mar0602.htm>. Tanggal akses 12 Desember 2007.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Media Induksi dan Pemeliharaan Emrio Somatik Kedelai

Tabel 1. Komposisi Makronutrien dan Mikronutrien Media

Nama Bahan	Berat (mg/L)
<b>Makronutrien*</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KHPO <sub>4</sub>	170
<b>Makronutrien*</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> .EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Myo inositol*</b>	
	100
<b>Vitamin B5**</b>	
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxin HCl	0,0
Thiamin HCl	0,1
Glycine	2

Keterangan: \* Murashige dan Skoog (1962)

\*\* Gamborg dkk. (1968)

Tabel 2. Komposisi Larutan Stok Media Induksi dan Pemeliharaan ES Kedelai dalam Volume 100 ml

Larutan stok	Nama Bahan	Berat untuk 100 ml (gr)	Pengambilan untuk 1 L media (ml)
A (5x)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,25	20
B (5x)	KNO <sub>3</sub>	9,50	20
C (10x)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,40	10
D (10x)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,70	10
	KHPO <sub>4</sub>	1,70	
E (20x)	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,56	5
	NA <sub>2</sub> .EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,75	
F (20x)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,12	5
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,34	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,17	
G (20x)	KI	0,2	0,5
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005	
Vitamin B5 (100x)	Nicotinic acid	0,05	1
	Pyridoxin HCl	0,05	
	Thiamin HCl	0,01	
	Glycine	0,20	
Myo inositol (10x)	Myo inositol	1,00	1

## Lampiran 2. Komposisi Larutan untuk Analisis Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Peroksidase

### 1. Larutan Ekstraksi

Buffer  $\text{PO}_4$  0,1 M pH 6,8 yang mengandung 0,1 mM NaEDTA dan 100 mg PVP, yaitu:

- a. 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2,4 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades (larutan 1)
- b. 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,84 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades (larutan 2)

larutan 1 sebanyak 102 ml dititrasi dengan larutan 2 sampai pH 6,8. Kemudian buffer  $\text{PO}_4$  0,1 M pH 6,8 sebanyak 220 ml ditambahkan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  sebanyak 8,2 mg dan PVP sebanyak 4,4 gram, lalu distirer.

### 2. Larutan untuk Analisis Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase

#### 1. Buffer Tris Saline pH 8,9

NaCl sebanyak 8,7 gram dan Tris sebanyak 1,21 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades dan diatur pH 8,9

#### 2. Riboflavin (600 $\mu\text{M}$ dalam KOH 5 mM)

KOH 5 mM adalah KOH sebanyak 2,8 mg dilarutkan dalam 10 ml akuades. Kemudian ditambahkan riboflavin sebanyak 2,258 mg dalam 10 ml KOH 5 mM

#### 3. NBT 6 mM

NBT sebanyak 4,906 mg dilarutkan dalam 10 ml akuades

#### 4. BSA (0,0033% w/v)

BSA sebanyak 0,0033 gram dilarutkan dalam 10 ml akuades

### 3. Larutan untuk Analisis Aktivitas Enzim Katalase

#### 1. Potassium Phosphat Buffer pH 7

a.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 1,361 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades (larutan 1)

b.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  sebanyak 2,282 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades (larutan 2)

larutan 1 sebanyak 102 ml dititrasi dengan larutan 2 sampai pH 7

#### 2. $\text{H}_2\text{O}_2$ 15 mM

$\text{H}_2\text{O}_2$  sebanyak 0,51015 ml ditambah akuades sampai volume 1 liter

#### 4. Larutan untuk Analisis Aktivitas Enzim Peroksidase

1. Buffer  $\text{PO}_4$  0,1 M pH 6,8

a. 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 2,4 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades (larutan 1)

b. 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sebanyak 2,84 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades (larutan 2)

102 ml larutan 1 dititrasi dengan larutan 2 sampai pH 6,8

2. Guaiacol 1,6%

Guaiacol sebanyak 0,48 ml ditambah akuades sampai volume 30 ml

3.  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,04 M

$\text{H}_2\text{O}_2$  absolut sebanyak 40 $\mu\text{L}$  ditambah akuades sampai volume 30 ml

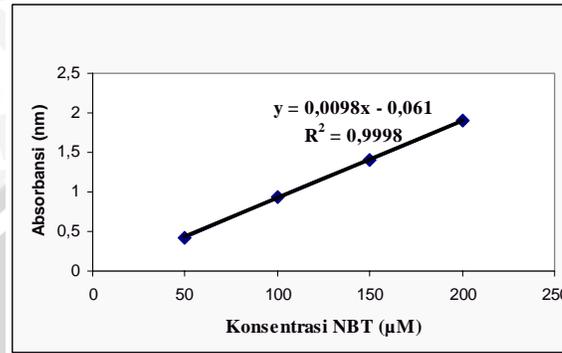
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



### Lampiran 3. Kurva Standar

Tabel 1. Nilai absorbansi pada beberapa konsentrasi nitroblue tetrazolium (NBT) untuk kurva standar SOD

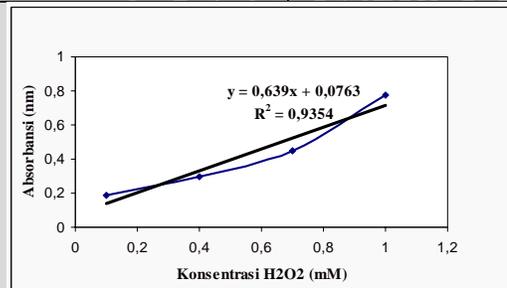
Konsentrasi NBT ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi (nm)
50	0,425
100	0,936
150	1,408
200	1,908



Gambar 1. Kurva standar aktivitas enzim SOD

Tabel 2. Nilai absorbansi pada beberapa konsentrasi  $\text{H}_2\text{O}_2$  untuk kurva standar Katalase

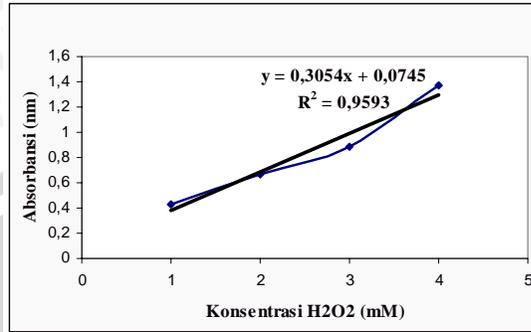
Konsentrasi $\text{H}_2\text{O}_2$ (mM)	Absorbansi (nm)
0,1	0,189
0,4	0,295
0,7	0,451
1	0,776



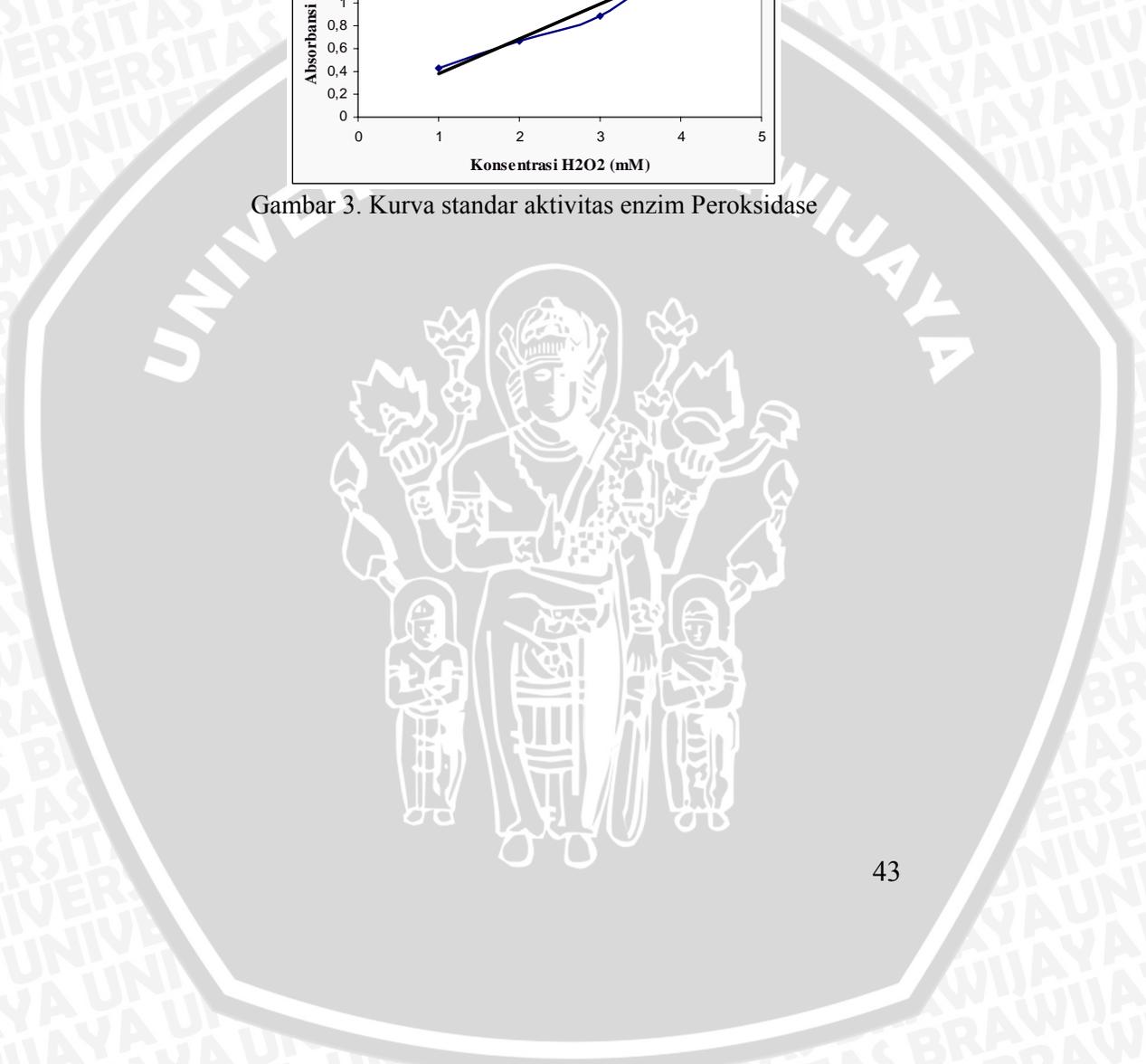
Gambar 2. Kurva standar aktivitas enzim Katalase

Tabel 3. Nilai absorbansi pada beberapa konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untuk kurva standar Peroksidase

Konsentrasi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Absorbansi (nm)
1	0,428
2	0,666
3	0,885
4	1,373



Gambar 3. Kurva standar aktivitas enzim Peroksidase



#### Lampiran 4. Hasil uji ANOVA Pengaruh Stres kekeringan terhadap Jumlah ES/eksplan pada Kedelai

Tabel 1. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap jumlah ES/eksplan pada kedelai varietas Dieng

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Konsentrasi PEG	197,256	3	65,752	97,845	0,000
Galat	10,752	16	0,672		
Total	1639,440	20			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05

Tabel 2. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap jumlah ES/eksplan pada kedelai varietas Burangrang

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Konsentrasi PEG	912,400	3	304,133	671,376	0,000
Galat	7,248	16	0,453		
Total	3537,120	20			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05



### Lampiran 5. Hasil uji ANOVA Pengaruh Stres kekeringan terhadap Aktivitas Enzim pada Embrio Somatik Kedelai

Tabel 1. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim SOD pada ES kedelai

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Varietas	0,035	1	0,035	8,165	0,021
Konsentrasi PEG	0,242	3	0,081	18,935	0,001
Varietas * Konsentrasi PEG	0,006	3	0,002	0,496	0,695
Galat	0,034	8	0,004		
Total	405,351	16			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05

Tabel 2. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim katalase pada ES kedelai

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Varietas	16,724	1	16,724	22,101	0,002
Konsentrasi PEG	20,774	3	6,925	9,151	0,006
Varietas * Konsentrasi PEG	18,715	3	6,238	8,244	0,008
Galat	6,054	8	0,757		
Total	4.522,056	16			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05

Tabel 3. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Varietas	4.939,630	1	4.939,630	7,460	0,026
Konsentrasi PEG	14.370,717	3	4.790,239	7,235	0,011
Varietas * Konsentrasi PEG	63.566,795	3	21.188,932	32,002	0,000
Galat	5.296,962	8	662,120		
Total	2.506.424,584	16			

\* beda nyata jika nilai Sig. &lt; 0,05

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**Lampiran 6. Hasil uji ANOVA Pengaruh Stres kekeringan terhadap Aktivitas Enzim pada Embrio Somatik Kedelai Varietas Dieng dan Burangrang**

Tabel 1. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim SOD pada ES kedelai varietas Dieng (toleran)

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Konsentrasi PEG	0,122	3	0,041	6,196	0,055
Galat	0,026	4	0,007		
Total	198,932	8			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05

Tabel 2. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim katalase pada ES kedelai varietas Dieng (toleran)

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Konsentrasi PEG	3,335	3	1,112	2,854	0,169
Galat	1,558	4	0,390		
Total	2.516,255	8			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05

Tabel 3. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas Dieng (toleran)

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Konsentrasi PEG	10.198,124	3	3.399,375	4,035	0,106
Galat	3.369,867	4	842,467		
Total	1.115.868,663	8			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05

Tabel 4. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim SOD pada ES kedelai varietas Burangrang (peka)

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Konsentrasi PEG	0,126	3	0,042	21,667	0,006
Galat	0,008	4	0,002		
Total	206,420	8			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05

Tabel 5. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim katalase pada ES kedelai varietas Burangrang (peka)

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Konsentrasi PEG	36,155	3	12,052	10,723	0,022
Galat	4,496	4	1,124		
Total	2.005,802	8			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05

Tabel 6. Hasil uji ANOVA pengaruh stres kekeringan terhadap aktivitas enzim peroksidase pada ES kedelai varietas Burangrang (peka)

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Konsentrasi PEG	67.739,388	3	22.579,796	46,868	0,001
Galat	1.927,095	4	481,774		
Total	1.390.555,921	8			

\* beda nyata jika nilai Sig. < 0,05