

Prolin, Asam Askorbat, dan Kandungan Air Relatif pada Tanaman C₃ dan C₄ yang Tercekam Kekeringan

Selis Meriem^{*1}, Arlinda Puspita Sari², Pinta Pasaribu³

¹Jurusan Biologi, FST, UIN Alauddin Makassar

Jl. H.M Yasin Limpo No. 36, Kab. Gowa, Sulawesi Selatan 92113

*Email: selis.meriem@uin-alauddin.ac.id

²Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Sulawesi Barat

Jl. Nedan No.1, Lutang Kec. Tande Timur, Kab. Majene, Sulawesi Barat 91413

³Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Jakarta

Jl. Rawamangun Muka, Rawamangun, Jakarta Timur 13220

Abstrak

Cekaman kekeringan menurunkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang bahkan berdampak terhadap pengurangan produktivitas tanaman. Tanaman mengaktifkan berbagai mekanisme fisiologi pertahanan terhadap stres air. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kadar prolin (Pro), asam absisat (ABA), dan kandungan air relatif (KAR) pada jaringan daun tanaman C₃ dari bayam (*Amaranthus hybridus*) dan C₄ dari kangkung (*Ipomea reptana*) pada lama cekaman kekeringan 2 hari, 4 hari, 6 hari dan 8 hari. Parameter yang diukur adalah kandungan Pro, ABA, dan KAR pada kedua daun tanaman *A. hybridus* dan *I. reptana* pada setiap periode cekaman. Hasil studi menunjukkan konsentrasi Pro yang lebih tinggi pada tanaman kangkung selama 6 hari dan 8 hari. Prolin tertinggi dihasilkan oleh tanaman *I. reptana* pada durasi cekaman paling lama yaitu 8 hari (1.56 μmol prolin/g daun). Sedangkan nilai KAR tertinggi ditunjukkan oleh tanaman *A. hybridus* yaitu 1.00% pada lama cekaman 8 hari. Tingginya nilai Pro pada *I. reptana* merupakan respon fisiologi terhadap penurunan nilai KAR. Konsentrasi ABA yang tinggi pada *A. hybridus* yaitu sebanyak 3878.12/100 g sampel daun merupakan strategi tanaman C₃ dalam mengurangi laju transpirasi. Di sisi lain, tanaman C₄ yaitu *I. reptana* menunjukkan mekanisme pertahanan dengan meningkatkan osmoregulator Pro untuk menyeimbangkan osmotik sel saat nilai KAR menurun pada cekaman berkepanjangan.

Kata kunci— asam absisat, C₃, C₄, kandungan air relatif, prolin

Abstract

Drought stress reduces plant growth and development that even reduces crop productivity. Plants activate various physiological defense mechanisms against water stress. This study aimed to compare the contents of proline (Pro), abscisic acid (ABA), and relative water content (KAR) in the leaves tissue of C₃ plants from spinach (*Amaranthus hybridus*) and C₄ from water spinach (*Ipomea reptana*) during drought stress of 2 days, 4 days, 6 days, and 8 days. The parameters measured were the content of Pro, ABA, and KAR in both leaves of *A. hybridus* and *I. reptana* at each stress period. The results of the study showed that the concentration of Pro was higher in water spinach at 6 days and 8 days of drought stress. The highest proline was synthesized by *I. reptana* at the longest-term stress of 8 days (1.56 μmol proline/g leaf).

While the highest KAR value was shown by *A. hybridus*, namely 1.00% at 8 days stress. The high value of Pro in *I. reptana* was a physiological response to the decrease of KAR value. The high ABA concentration in *A. hybridus* as much as 3878.12/100 g leaf samples is a strategy for C_3 plants to reduce the transpiration rate. On the other hand, the C_4 plant of *I. reptana* demonstrated a defense mechanism by increasing the Pro osmoregulator to balance the osmotic cells when the KAR value decreased under prolonged stress.

Keywords— abscisic acid, C_3 , C_4 , proline, relative water content

1. PENDAHULUAN

Cekaman kekeringan menghambat proses metabolisme, proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman [1]. Dampak negatif ini cukup menurunkan produktivitas pertanian [2,3]. Stres abiotik ini disebabkan oleh rendahnya ketersediaan air di daerah rizosfer dan atau laju transpirasi melebihi penyerapan air. Cekaman air menurunkan potensial air dalam jaringan tanaman dan menahan laju penambahan volume sel. Tanaman merespon cekaman ini dengan meningkatkan produksi senyawa *reactive oxygen species* (ROS) yang menghambat fotosintesis, respirasi, dan struktural sel tumbuhan [4].

Tumbuhan memiliki mekanisme khusus dalam mengatasi cekaman kekeringan. Akumulasi prolin (Pro) dan asam askorbat (ABA) merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan sebagai respon akibat defisit air dan cekaman salinitas. Senyawa ini lebih banyak ditemukan pada tanaman yang toleran terhadap cekaman [5]. Prolin berfungsi sebagai osmoregulator, melindungi membran dan protein terhadap tingginya konsentrasi ion-ion anorganik dan suhu ekstrim. Saat cekaman kekeringan, indikator utama kelayuan dan penurunan parameter pertumbuhan ditandai dengan penumpukan prolin yang tinggi pada akar tanaman [6]. Selain prolin, hormon asam absisat berperan sebagai agen reduksi yang dapat menetralkan spesies oksigen reaktif (ROS) seperti hidrogen peroksida dan penginduksi penutupan stomata saat tercekam air [7].

Status air jaringan tanaman merupakan salah satu indikator ketersediaan air tanah. Campos *et al.* [8] melaporkan bahwa tanaman yang mengalami kekeringan akibat kehilangan air tanah menyebabkan penurunan potensial air daun dan rendahnya konduktansi stomata. Lebih lanjut, cekaman air pada jaringan tanaman ini menyebabkan penurunan asimilasi CO_2 akibat rendahnya laju karboksilasi dan regenerasi ribulosa 1.5-bifosfat (RuBP).

Penelitian mengenai mekanisme fisiologi pada tanaman C_3 dan C_4 dari jenis sayuran masih minim, khususnya kajian prolin dan asam absisat. Tujuan dari studi ini adalah untuk membandingkan kadar prolin, asam absisat, dan kandungan air relatif pada jaringan daun tanaman C_3 dari bayam (*Amaranthus hybridus*) dan C_4 dari kangkung (*Ipomea reptana*) pada lama cekaman kekeringan 2 hari, 4 hari, 6 hari dan 8 hari.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Mei 2015 s.d. Juli 2015. Penanaman dan analisis kandungan prolin, ASA, dan KAR dilakukan di Rumah Kaca dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor.

2.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan yaitu benih bayam (*A. hybridus*), benih kangkung (*I. reptana*), polibag, media tanam (tanah dan kompos), asam sulfosalisilik 3%, asam metafosforik, DCIP, asam askorbat, ninhidrin, asam asetat glacial, 6 mol H_3PO_4 , toluene, prolin, akuades, kertas saring *whatman*, labu ukur, mortar dan alu, tabung reaksi, vortex, oven, spektrofotometer, timbangan analitik, kompor, panci, corong, alat titrasi, pipet tetes, pipet volume, cawan petri, kuvet, gelas kimia, dan alat pelubang daun (*cod borer*).

2.3 Penanaman dan pemeliharaan tanaman

Benih bayam (*A. hybridus*), dan kangkung (*I. reptana*) ditanam pada polibag yang telah berisi media tanam (tanah dan kompos dengan perbandingan 3:1), masing-masing 4 biji per polibag. Penyiraman dilakukan setiap hari di pagi dan sore hari sampai tanaman berumur 1.5 bulan. Kemudian setiap tanaman diberi cekaman kekeringan selama 2 hari, 4 hari, 6, dan 8 hari. Daun tanaman dipetik untuk dianalisa kandungan prolin, ASA (Asam Askorbat), dan KAR (Kandungan Air Relatif).

2.4 Analisis Kandungan Prolin

Sebanyak 0.5 g daun diekstraksi dalam 10 ml asam sulfosalisilik 3% menggunakan mortar kemudian disaring dengan kertas saring. Larutan asam ninhidrin dibuat dengan melarutkan 1.25 g ninhidrin dalam campuran 30 ml asam asetat glasial dan 20 ml 6 M H_3PO_4 hangat hingga larut, didinginkan dan disimpan pada suhu 4°C. Sebanyak 2 ml filtrat direaksikan dengan 2 ml larutan asam ninhidrin dan 2 ml asam asetat glasial pada tabung reaksi selama 1 jam pada suhu 100°C, kemudian proses diakhiri dalam *ice bath*. Selanjutnya campuran ini diekstraksi dengan 4 ml toluene, dihomogenkan dengan vortex, dan diukur absorbansinya pada 520 nm menggunakan spektrofotometer. Larutan toluene digunakan sebagai larutan blanko. Konsentrasi prolin ditentukan dengan kurva standar prolin murni dan dihitung berdasarkan berat sampel dengan rumus (1):

$$\mu\text{mol prolin/g daun} = \frac{\text{ug prolin/ml (ppm)} \times \text{vol.toluene} / 115.5 \text{ ug prolin/umol}}{\text{massa sampel/5}} \quad (1)$$

2.5 Analisis Kandungan ASA

Sebanyak 0.5 gram sampel daun digerus dengan 5% asam metafosforik dan disaring menggunakan kertas saring. Larutan hasil saringan dititrasi dengan dichlorophenol-indophenol (DCIP) 0.8 g/l. Larutan DCIP distandarisasi dengan larutan asam askorbat murni. Jika terjadi perubahan warna larutan menjadi warna pink, titrasi dihentikan. Konsentrasi ASA dihitung menggunakan rumus (2) dan (3) berikut Reiss, 1993):

$$\text{Standarisasi larutan ASA: } \frac{\text{ASA (mg)}}{7 \text{ mg DCIP}} = \frac{4 \text{ mg ASA murni}}{\text{DCIP yang dititrasi (ml)}} \quad (2)$$

Kandungan ASA per 100 g sampel:

$$\text{mg ASA} \times \frac{\text{total volume ekstrak (ml)}}{\text{volumen DCIP (ml)}} \times \frac{100}{\text{massa sampel (g)}} \quad (3)$$

2.6 Analisis KAR

Daun tanaman yang telah berkembang sempurna di lubang dengan *cod borer* berdiameter 0.5 cm sebanyak 10 potong, ditimbang menggunakan timbangan analitik sehingga diperoleh berat basah. Sampel direndam dalam akuades selama 24 jam, kemudian timbang kembali untuk menghasilkan berat jenuh. Selanjutnya sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C dan diukur berat kering. Kandungan Air Relatif (KAR) dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (4) :

$$\text{Kandungan Air Relatif (KAR)} = \frac{\text{Berat basah (g)} - \text{Berat kering (g)}}{\text{Berat jenuh (g)} - \text{Berat kering (g)}} \times 100 \% \quad (4)$$

2.7 Analisis Data

Pengaruh jenis tanaman yaitu bayam (*A. hybridus*) dan kangkung (*I. reptana*) pada setiap lama cekaman dan *rewatering* terhadap parameter kandungan prolin, ASA dan KAR dibandingkan menggunakan uji *Independent Sample t-test* dengan $\alpha = 5\%$. Seluruh analisis data dilakukan menggunakan SPSS ver.25.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan prolin (Pro) pada kangkung (*Ipomea reptana*) nyata lebih tinggi dibandingkan bayam (*Amaranthus hybridus*) pada lama cekaman 6 hari dan 8 hari (Tabel 1). Sedangkan bayam menunjukkan konsentrasi Pro yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan kangkung pada perlakuan kontrol dan lama cekaman 4 hari (Tabel 1). Hal ini membuktikan bahwa tanaman kangkung yang tergolong jenis C₄ meningkatkan produksi senyawa terlarut berupa Pro jika tercekam kekeringan pada durasi yang lebih lama. Adaptasi ini merupakan osmoregulator dan osmoprotektan sebagai bentuk mekanisme fisiologi tanaman dalam mempertahankan turgor sel dan keseimbangan osmotik. Szabados & Savouré [9] mengemukakan bahwa Pro mempertahankan homeostatis dan reaksi redoks sel sebagai bentuk fungsi osmoregulator dan memicu ekspresi gen terkait pemulihan tanaman setelah tercekam. Durasi cekaman yang lebih lama bahkan meningkatkan konsentrasi Pro pada daun [10] dan akumulasi metabolit sekunder [11].

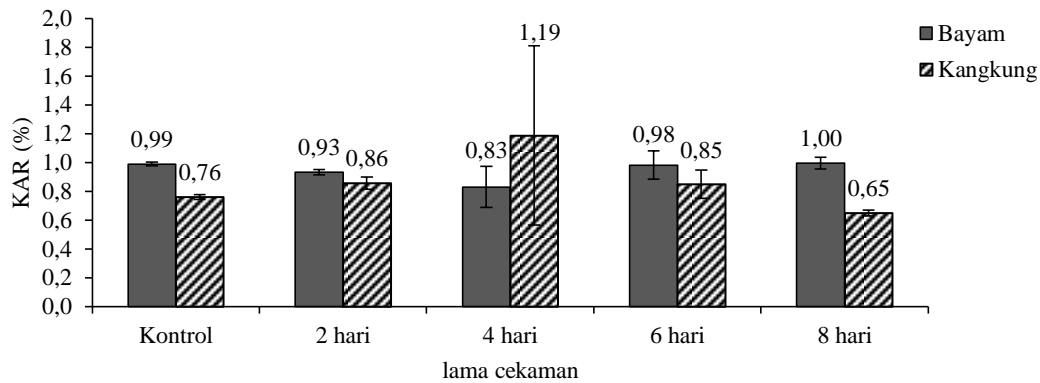
Tabel 1. Pengaruh cekaman kekeringan terhadap kandungan prolin bayam (*A. hybridus*) dan kangkung (*I. reptana*)

Perlakuan	Bayam	Kangkung
Kontrol	1.55 (0.005)**	1.42 (0.000)**
Cekaman 2 hari	1.57 (0.017)ts	1.55 (0.015)ts
Cekaman 4 hari	1.71 (0.022)**	1.60 (0.018)**
Cekaman 6 hari	1.54 (0.005)**	1.59 (0.009)**
Cekaman 8 hari	1.49 (0.005)**	1.56 (0.009)**

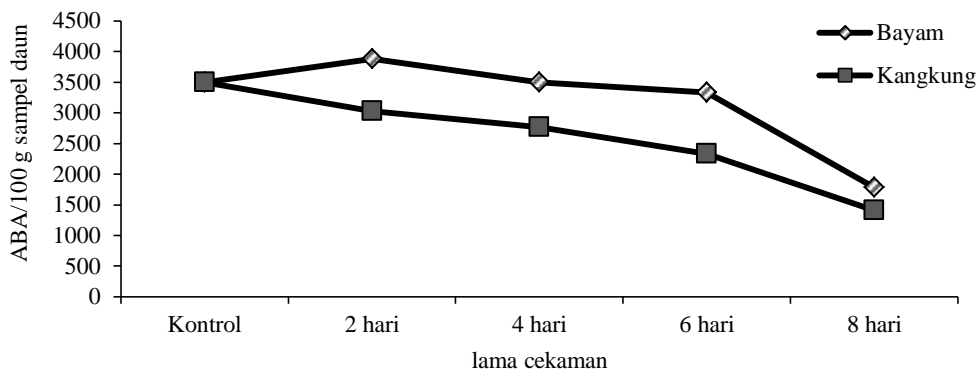
Nilai menunjukkan mean \pm SE. * $p < 0.01$. ** $p < 0.05$. ^{ts}tidak signifikan. Data diuji dengan Independent Sample t-test pada $p < 0.05$. BB – Berat Basah.

Perlakuan kontrol dan cekaman selama 8 hari menunjukkan kandungan air relatif yang signifikan lebih tinggi pada tanaman bayam dibandingkan kangkung (Gambar 1). Tingginya Pro pada kangkung selama tercekam kekeringan 8 hari merupakan indikasi dari kandungan air relatif yang menurun dalam jaringan daun.

Penanda KAR yang rendah memicu peningkatan biosintesis Pro oleh tanaman C₄ yaitu kangkung. Sedangkan indikator KAR yang lebih tinggi pada tanaman bayam dengan lama cekaman 8 hari mungkin disebabkan oleh konsentrasi fitohormon ABA yang relatif lebih tinggi sejak perlakuan cekaman pertama hingga 6 hari cekaman (Gambar 2). Periode lebih lama pada 8 hari cekaman justru menurunkan nilai ABA pada bayam. Hal ini dapat dikaitkan dengan kandungan Pro yang rendah dan menunjukkan tren yang cenderung menurun pada bayam seiring dengan meningkatnya periode cekaman.



Gambar 1. Pengaruh cekaman kekeringan terhadap KAR (Kandungan Air Relatif) pada bayam (*A. hybridus*) dan kangkung (*I. reptana*). Nilai menunjukkan mean ± SE. Data diuji menggunakan Independent Sample t-test pada $p < 0.05$.



Gambar 2. Pengaruh cekaman kekeringan terhadap kandungan ABA (asam absisat) bayam (*A. hybridus*) dan kangkung (*I. reptana*).

Tanaman yang stres kekeringan menunjukkan peningkatan Pro namun terjadi reduksi enzim rubisko, nitrat reduktase dan ATP-sulfurilase sehingga menurunkan asimilasi karbon, nitrogen, dan sulfur [12]. Lebih lanjut Nazar *et al.* [12] membuktikan bahwa parameter pertumbuhan dan fotosintesis mengalami peningkatan ketika ditambahkan asam absisat eksogen. Pada penelitian ini, secara fisiologi tanaman bayam menunjukkan konsentrasi ABA yang relatif lebih tinggi dibandingkan kangkung selama perlakuan cekaman kekeringan (Gambar 2). Namun hal ini tidak diikuti dengan peningkatan Pro. Fitohormon ini menginduksi penutupan sebagian stomata sebagai

respon terhadap cekaman kekeringan untuk menghambat laju evapotranspirasi dan fotorespirasi pada tanaman C₃. Walaupun pada kondisi stomata tertutup, dibandingkan tanaman C₃, tanaman C₄ mampu mempertahankan konsentrasi CO₂ internal untuk fiksasi oleh enzim rubisko sehingga mencegah jalur fotorespirasi. Karbon ini berasal dari fiksasi CO₂ oleh enzim PEP karboksilase yang membentuk simpanan senyawa berkarbon empat seperti malat yang tinggi pada jaringan mesofil saat stomata terbuka [13]. Secara anatomi, fiksasi senyawa berkarbon empat berlangsung dalam seludang pembuluh yang hanya terspesialisasi pada jaringan daun tanaman C₄ [14]. Jika dilihat dari aspek morfologi, Hamama & Murniati [15] melaporkan bahwa penambahan ABA mampu memperbaiki viabilitas dan vigor tanaman yang tercekam kekeringan.

Peningkatan ROS yang tajam saat cekaman menginduksi biosintesis Pro [16]. Hasil penelitian ini juga membuktikan bahwa Pro yang tinggi pada tanaman C₄ merupakan bentuk antioksidan alami dalam menangkal pembentukan senyawa ROS (*reactive oxygen species*) yang bersifat toksik terhadap metabolisme dan komponen struktural sel. Dengan demikian, tanaman C₃ dan C₄ menunjukkan mekanisme yang berbeda terhadap penanganan stres kekeringan. Kangkung mengaktifkan gen-gen terkait sintesis osmoregulator terlarut ini dalam jumlah besar ketika kandungan air relatif jaringan menurun pada stres kekeringan berkepanjangan. Selain prolin, ekspresi gen asam absisat juga ditingkatkan pada tanaman bayam untuk mencegah kehilangan air yang berlebih dengan mempertahankan nilai KAR.

Cekaman kekeringan mengakibatkan tumbuhan dengan jalur fotosintesis C₃ akan menutup stomatanya pada kondisi kekeringan. Hal ini menyebabkan fotosintesis netto menurun dan fotorespirasi meningkat. Akan tetapi, tumbuhan C₄ mempunyai kemampuan menyediakan CO₂ pada sisi aktif rubisko walaupun kondisi cekaman kekeringan menginduksi stomata tertutup sehingga cukup efisien dalam menghemat air.

4. KESIMPULAN

Kandungan prolin pada tanaman kangkung (*I. reptana*) lebih tinggi dibandingkan bayam (*A. hybridus*) pada lama cekaman 6 dan 8 hari. Nilai KAR yang tinggi ditunjukkan oleh bayam dibandingkan kangkung pada cekaman terlama yaitu 8 hari. Konsentrasi ABA pada bayam cenderung lebih tinggi dibandingkan kangkung selama periode cekaman kekeringan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ai, N. S. 2011. Biomassa dan Kandungan Klorofil Total Daun Jahe (*Zingiber officinale* L.) yang Mengalami Cekaman Kekeringan. *Jurnal Ilmiah Sains*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.35799/jis.11.1.2011.31>
- [2] Supriyanto, B. 2013. Pengaruh Cekaman Kekeringan terhadap Pertumbuhan dan Hasil Padi Gogo Lokal Kultivar Jambu (*Oryza sativa* Linn.). *AGRIFOR*, 12(1), 77–82.
- [3] Tubur, H. W., Chozin, M. A., Santosa, E., & Junaedi, A. 2013. Respon Agronomi Varietas Padi terhadap Periode Kekeringan pada Sistem Sawah. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 40(3), 167–173. <https://doi.org/10.24831/jai.v40i3.6796>
- [4] Kreslavski, V. D., Los, D. A., Allakhverdiev, S. I., & Kuznetsov, V. V. 2012. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stres. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 141–154. <https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
- [5] Swasono, F. D. H. 2012. Peran ABA dan Prolina dalam Mekanisme Adaptasi Tanaman

- Bawang Merah terhadap Cekaman Kekeringan di Tanah Pasir Pantai. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 4(5), 71–79.
- [6] Efendi, R., & Azrai, M. 2010. Tanggap genotipe jagung terhadap cekaman kekeringan: peranan akar. *Jurnal Penelitian Pertanian Pangan*, 29(1), 1–10.
- [7] Kar, R. K. 2011. Plant responses to water stres: Role of reactive oxygen species. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11), 1741–1745. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17729>
- [8] Campos, H., Trejo, C., Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, R., Conde-Martínez, F. V., & Cruz-Ortega, M. R. 2014. Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under water stres and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.015>
- [9] Szabados, L., & Savouré, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- [10] Ajithkumar, I. P., & Panneerselvam, R. 2013. O smolyte accumulation , photosynthetic pigment and growth of *Setaria italica* (L .) P . B eauv . under drought stres. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(3), 220–224. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60151-7](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60151-7)
- [11] Witt, S., Galicia, L., Lisec, J., Cairns, J., Tiessen, A., Luis, J., & Palacios-rojas, N. 2012. Metabolic and Phenotypic Responses of Greenhouse-Grown Maize Hybrids to Experimentally Controlled Drought Stres. *Molecular Plant*, 5(2), 401–417. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr102>
- [12] Nazar, R., Umar, S., Khan, N. A., & Sareer, O. 2015. Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stres. *South African Journal of Botany*, 98, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.02.005>
- [13] Qian, B., Li, X., Liu, X., Chen, P., Ren, C., & Dai, C. 2015. Enhanced drought tolerance in transgenic rice over-expressing of maize C 4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene via NO and Ca²⁺. *Journal of Plant Physiology*, 175, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.09.019>
- [14] Wibawani, A. I., & Laily, A. N. 2015. Identifikasi Tanaman Berdasarkan Tipe Fotosintesis Pada Beberapa Spesies Anggota Genus *Ficus* Melalui Pengamatan Anatomi Daun. *El-Hayah*, 5(2), 43. <https://doi.org/10.18860/elha.v5i2.3012>
- [15] Hamama, H., & Murniati, E. 2010. The Effect of Ascorbic Acid Treatment on Viability and Vigor Maize (*Zea mays* L.) Seedling under Drought Stres. *HAYATI Journal of Biosciences*, 17(3), 105–109. <https://doi.org/10.4308/hjb.17.3.105>
- [16] Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(9), 998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>