

## PERUBAHAN AKTIVITAS ENZIM PEROKSIDASE SELAMA ORGANOGENESIS KALUS PADI (*Oryza sativa* L.) KULTIVAR LALAN

Laila Hanum dan Juswardi  
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya.

### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang perubahan enzim peroksidase (PO) kalus padi kultivar Lalan selama organogenesis. Kalus diinduksi dari biji padi pada medium dasar Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah  $10^{-5}$  M asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-D). Selanjutnya kalus diregenerasi pada medium pertunasan (shoot) dan medium perakaran (root). Pada organogenesis kalus membentuk pinak tanaman dievaluasi kadar protein dan perubahan aktivitas PO. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar protein dan perubahan aktivitas PO selama organogenesis. Kadar protein pada organogenesis shoot, root dan pinak tanaman lebih tinggi dari proliferasi kalus. Perubahan aktivitas PO pada organogenesis shoot meningkat, organogenesis root menurun dan pada pinak tanaman kembali menurun menyamai aktivitas PO kalus.

### ABSTRACT

Changes in peroxidase enzyme activity in callus of the Lalan cultivar rice (*Oryza sativa* L.) during organogenesis. The investigation was carried out to changes in peroxidase activity (PO) in the cultivar Lalan rice calli during organogenesis. The rice calli were induced from Lalan rice seeds on Murashige and Skoog basal medium with add  $10^{-5}$  M 2,4-dichlorophenoxyasetat acid (2,4-D). Then calli were regenerated at MS medium induction shoot and medium induction root. Total protein and peroxidase activity were evaluated in shooting, rooting and shooting with rooting (plantlet). The results of experiment show that total protein and PO activity during organogenesis were changing of PO activity during organogenesis were increase in shooting, decrease in rooting and then decrease in plantlet as same as PO activity in callus.

### PENDAHULUAN

Padi subspecies *javanica* merupakan padi yang umumnya hidup di kepulauan Indonesia. Padi *javanica* mempunyai sifat-sifat unggul

terhadap cekaman lingkungan, diantaranya mempunyai sistem perakaran yang dalam sehingga mudah mendapatkan hara, disamping itu juga mempunyai batang yang tinggi sehingga cocok dibudidayakan untuk lingkungan pasang surut, rawa dan lebak (Masyhudi, 1992). Padi *javanica* yang

banyak dibudidayakan untuk lahan pasang surut, rawa dan lebak umumnya adalah kultivar lokal seperti Lalan, Banyu Asin, Sei Lilin, Lematang, Musi, Barito dan Kapuas.

Sejalan dengan perkembangan bioteknologi terutama dalam bidang kultur jaringan yang dapat memberikan informasi baru mengenai sifat-sifat dasar tanaman padi. Teknik kultur jaringan juga mempunyai keunggulan untuk memperbaiki sifat-sifat tanaman.

Penelitian tentang teknik kultur jaringan padi telah dilakukan di Jepang sejak tahun 1960-an. Furuhashi dan Yatazawa tahun 1964 pertama kali yang berhasil dalam induksi kalus menghasilkan ruas batang padi dengan menggunakan ekstrak yeast sebagai faktor essential memperbaiki pertumbuhan (Yamada, 1977).

Penelitian awal yang telah dilakukan pada padi kultivar Lalan dan Sei Lilin adalah induksi kalus, kemampuan regenerasi lini kalus padi hasil seleksi over produksi asam amino lisin. Selama organogenesis dalam rangka regenerasi kalus membentuk pinak tanaman juga terjadi perubahan metabolisme. Perubahan

secara fisiologi yang dapat diamati adalah aktivitas enzim-enzim marka (penanda).

Menurut Calderon *et al.* (1994 ; Castillo, 1986 ; Groven dan Byrne, 1975 ; Wijsman dan Hendriks, 1986 dalam Juswardi, 1996) enzim yang dapat digunakan sebagai penanda fisiologi antara lain enzim fosfatase asam, superoksidase dismutase, katalase, polifenoloksidase dan peroksidase.

Peroksidase (PO. EC. 1.11.1.7) adalah kelompok enzim oksidoreduktase. Menurut (Tyson, 1992 dalam Dean *et al.*, 1994) enzim PO terdistribusi luas pada tumbuhan, ditemukan pada organ sampai pada berbagai komponen sel. Enzim ini mempunyai bentuk ragam (isozim) yang penting dalam fungsi sel. Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa enzim PO ini banyak digunakan dalam pemantauan beberapa proses fisiologi tumbuhan. Macheix (1993) mempelajari perubahan aktivitas PO selama organogenesis tunas kurma.

Aktivitas PO dipengaruhi oleh keadaan fisiologi internal, seperti absisi, senesens, pembungaan, pertunasan dari tumbuhan. Perubahan aktivitas juga terjadi pada proliferasi dan organogenesis dari kalus (Booij, *at al.* 1993 ; Mc Manus, 1994 ; Van Huystee dan Cairns, 1992).

Selama organogenesis dari kalus membentuk pinak tanaman juga terjadi perubahan metabolisme. Perubahan secara fisiologi (enzimatis) yang dapat digunakan sebagai marka organogenesis adalah enzim PO. Maka perlu dilakukan penelitian dengan tujuan melihat perubahan aktivitas enzim peroksidase selama organogenesis kalus padi kultivar Lalan membentuk pinak tanaman.

## METODOLOGI

### Bahan Penelitian

Sumber eksplan yang digunakan untuk seleksi kalus adalah padi sub-spesies *javanica*. Benih padi didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Pangan Sumatera Selatan, Palembang.

### Induksi kalus

Komposisi medium yang digunakan untuk menginduksi kalus adalah medium dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang dimodifikasi. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4-D (asam 2,4-diklorofenoloksiasetat).

### Organogenesis lini kalus

Dalam organogenesis yang diinduksi pertama adalah pucuk setelah itu diinduksi

akar. Untuk menginduksi kalus membentuk shoot (pucuk) kalus disubkultur pada MS yang ditambah  $10^{-6}$  M kinetin dan  $5.10^{-6}$  M 2,4-D. Sedangkan untuk menginduksi akar hanya ditambah 2,4-D saja dengan konsentrasi  $10^{-5}$

### Ekstraksi protein dan enzim

Ekstraksi dilakukan menurut metoda (Widiyanto, 1992 dalam Juswardi, 1996) yang dimodifikasi. Sebanyak 200 mg sampel digerus dalam nitrogen cair dan dihomogenasi dalam 2,0 ml 0,0625 M dapar Tris-HCL pH 8,0 dan 0,15% Trion-X100 pada suhu  $0^{\circ}\text{C}$ . Homogenat yang didapatkan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.500 g pada suhu  $0^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit. Supernatan yang didapatkan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan disimpan pada suhu  $0 - 4^{\circ}\text{C}$  untuk ditentukan kadar protein total dan aktivitas enzimnya.

### Penentuan kadar protein total

Penentuan kadar protein total dilakukan dengan menggunakan reagen biuret (Biosystem). Penentuan kadar protein ini dilakukan secara spektrofotometri pada  $\lambda$  545 nm. Sebagai protein standar digunakan "bovine serum albumin".

### Penentuan aktivitas enzim PO

Aktivitas PO ditentukan berdasarkan metoda Kar dan Misra (1976 dalam Juswardi, 1996) yang dimodifikasi. Campuran pereaksi yang digunakan 10 mM pirogalol, 0,0625 mM dapar fosfat pada pH 6,8. Ke dalam 5 ml campuran pereaksi ditambah 10 mM peroksida, selanjutnya ditambahkan 20 µg protein dan diinkubasikan pada suhu 25°C selama 5 menit. Hasil oksidasi pirogalol (purpurogalin) diukur dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  420 nm.

### Analisis data

Data kadar protein dan aktivitas enzim PO dianalisis varians pada  $\alpha$  0,05. Bila terdapat perbedaan yang nyata dilakukan uji lanjut perbandingan berganda Duncans pada  $\alpha$  0,05. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program Stat Soft™ (Stastistica™) Campton (1994).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan tentang kadar protein total dan aktivitas enzim peroksidase selama organogenesis kalus padi kultivar Lalan didapatkan hasil sebagai berikut :

### Kadar Protein Total

Kadar protein total yang diukur secara spektrofotometri dengan reagen biuret pada  $\lambda$  545 nm didapatkan hasil seperti Tabel 1. berikut :

Analisis varians kadar protein total dari organogenesis kalus padi kultivar Lalan menunjukkan perbedaan yang nyata. Adanya perbedaan kadar protein total tersebut karena tahap-tahap dari pertumbuhan dan perkembangan adanya protein tertentu yang disintesis dan protein tertentu lainnya yang ditekan. Hal ini dijelaskan Lyndon (1990) bahwa pola dan pengontrolan pertumbuhan dan perkembangan dikendalikan oleh gen. Gen-gen tertentu diekspresikan untuk sintesis protein tertentu tersebut, sehingga menghasilkan suatu bentuk pertumbuhan dan perkembangan.

Tabel 1. Kadar protein total pada perubahan aktivitas peroksidase selama organogenesis (proliferasse khusus) kalus padi (*Oryza sativa* L.) kultivar Lalan.

Proliferasse Khusus (organogenesis)	Kadar Protein Total (µg. ml <sup>-1</sup> )
Kalus	361,50 a
Shoot	1163,25 c
Root	793,25 b
Shoot + Root	918,50 b

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada  $\alpha$  0,05.

Tabel 1. dapat dilihat bahwa kadar protein total dari masing-masing proliferasi khusus (organogenesis) berbeda nyata dibanding proliferasi kalus. Secara umum kadar protein kalus lebih rendah dibanding dengan kadar protein saat organogenesis. Hal ini disebabkan karena saat proliferasi khusus dari kalus hanya diperlukan protein untuk siklus sel saja, sedang saat proliferasi khusus (organogenesis) ada protein lain yang disintesis selain protein siklus sel tersebut. Protein lain tersebut mungkin protein struktural atau fungsional seperti enzim yang dibutuhkan dalam serangkaian metabolisme untuk organogenesis tersebut.

Kadar protein total yang tertinggi ditemukan saat pembentukan shoot (pucuk). Hal ini disebabkan saat pembentukan pucuk terjadi diferensiasi yang kompleks seperti pembentukan batang, daun dan tunas. Kenyataan lain juga terlihat bahwa organogenesis pucuk dibutuhkan juga zat pengatur tumbuh golongan sitokinin (BAP) selain golongan auksin (2,4-D).

Kadar protein total saat organogenesis root (akar) lebih rendah

dibandingkan organogenesis lainnya. Rendahnya kadar protein tersebut karena untuk pembentukan akar tidak sekomples pembentukan pucuk. Pada pembentukan dan pertumbuhan akar primer, akar lateral tidak mempunyai pola dan pengatur yang spesifik seperti filotaksis daun dan tunas lateral (cabang).

Saat organogenesis kaduanya shoot dan root kadar protein total yang terdeteksi adalah seperti penjumlahan kadar protein pada pucuk dan akar. Karena penentuan kadar protein ini dilakukan pada pinak tanaman.

#### Aktivitas Enzim Peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase yang diukur secara spektrofotometri dengan substrat pirogalol dan peroksida pada  $\lambda$  545 nm didapatkan hasil sebagai berikut :

Analisis varians aktivitas peroksidase selama organogenesis kalus padi kultivar Lalan menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini disebabkan karena proliferasi khusus (organogenesis) melibatkan serangkaian aktivitas enzim. Seperti aktivitas PO yang terjadi berhubungan dengan proliferasi kalus dan proliferasi khusus (organogenesis).

Tabel 2. Aktivitas peroksidase selama proliferasi khusus (organogenesis) kalus padi (*Oryza sativa* L.) kultivar Lalan.

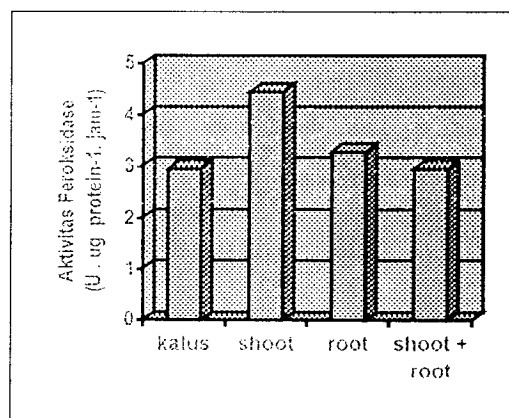
Proliferasi Khusus (organogenesis)	Aktivitas Peroksidase (U . $\mu\text{g protein}^{-1} \cdot \text{jam}^{-1}$ )
Kalus	2.948 c
Shoot	4.455 a
Root	3.275 b
Shoot + Root	2.955 c

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada  $\alpha$  0,05.

Menurut Chalderon *et al.* (1994, Castillo, 1986 ; Groven dan Byrne, 1975 ; Wijsman dan Hendriks, 1986 dalam Juswardi, 1996) enzim fosfatase asam, superoksida dismutase, katalase, polifenoloksidase dan peroksidase adalah enzim yang dapat digunakan dalam mengamati fisiologi tumbuhan. Selanjutnya Siminis *et al.* (1993) menyatakan aktivitas PO berhubungan dengan kemampuan regenerasi kultur protoplas.

Dari Tabel 2. terlihat bahwa aktivitas PO yang tertinggi adalah saat organogenesis shoot (pucuk) dan terendah ada proliferasi kalus serta diikuti shoot+root (pinak tanaman). Aktivitas PO ini mencerminkan arah pertumbuhan dan perkembangan

tumbuhan. Menurut Siminis *et al.* (1993) aktivitas PO dari dua tipe kultur protoplas, yaitu protoplas rekalsitran dan yang beregenerasi (non-rekalsitran) terdapat adanya perbedaan aktivitas PO. Pada kultur protoplas tembakau (beregenerasi) aktivitas PO beberapa kali lipat lebih tinggi dibandingkan protoplas anggur (rekalsitran). Kultur protoplas rekalsitran arah pertumbuhan tidak dapat dikendalikan sebaliknya dengan yang beregenerasi arah pertumbuhan dapat dikendalikan.



Gambar 1. Aktivitas peroksidase selama proliferasi khusus (organogenesis) kalus padi (*Oryza sativa* L.) kultivar Lalan.

Perubahan aktivitas PO selama organogenesis dari kalus padi kultivar Lalan menunjukkan suatu pola (Gambar 1). Pola ini berhubungan dengan tahap organogenesis

dalam rangka membentuk pihak tanaman dari kalus, yaitu induksi shoot dan induksi root. Perubahan aktivitas PO tersebut secara berurutan meningkat dengan tajam dari kalus ke shoot, dan menurun pada pembentukan root, dari kalus yang mempunyai shoot selanjutnya pada pinak tanaman kembali menurun menyamai aktivitas PO kalus.

Menurut Booijs *et al.* (1993) saat pembentukan shoot (pucuk-pucuk) dari kultur *in vitro* kalus kurma terjadi perubahan aktivitas yang mempunyai pola tertentu. Pola perubahan aktivitas PO tersebut adanya peningkatan aktivitas beberapa kali lipat (meningkat dengan tajam) setiap kali pembentukan pucuk-pucuk.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

### KESIMPULAN

1. Terdapat perbedaan kadar protein total dan aktivitas PO selama organogenesis dari kalus padi kultivar Lalan.

2. Kadar protein pada organogenesis shoot, root dan pinak tanaman lebih tinggi dibandingkan dengan proliferasi kalus.
3. Perubahan aktivitas PO saat regenerasi kalus membentuk pinak tanaman secara berurutan meningkat pada organogenesis shoot, menurun pada organogenesis root dan pada pinak tanaman kembali menurun menyamai kadar protein kalus.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang protein spesifik dan aktivitas enzim marka lainnya saat organogenesis dari kalus membentuk pinak tanaman.

## DAFTAR PUSTAKA

- Booij, I., S. Monfort dan J. Macheix. 1993. Relationships between of peroxidases and budding in Date Palm tissue cultured *in vitro*. Plant cell, Tiss. And Org. Cult. 5 : 162-171.
- Compton M. N. 1994. Statistical Methods Suitable for The Analysis of Plan Tissue Culture Data. Plans Celi, Tiss. and Organ. Cult. 37: 217-242.
- Dean, J.F.D., Sterjiades, R. dan Erikson, K-E.L. 1994. Purification and characterization of anionic peroxidase from Sycamor maple

- (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension culture. Physiol. Plant . 92 : 233 -240.
- Juswardi, 1996. Aktivitas Enzim Peroksidase kalus padi (*Oryza sativa* L) varian adaptasi cekaman Aluminium. Laporan hasil Penelitian. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sriwijaya. pp 13-22 (tidak di publikasi).
- Lyndon, R.F. 1990. Plant development : the cellular basis. Unwin Hyman Ltd. London.
- Macheix, J. 1993. Relationships between of peroxidases and budding in Date Palm tissue cultured *in vitro*. Plant cell, Tiss. And Org. Cult. 5 : 162-171.
- Masyhudi, M.F. 1992. Penerapan bioteknologi dalam pengembangan padi bulu. Jurnal Litbang. Pertanian XI : 23-31.
- Mc. Manus, M.T. 1994. Peroxidase in the separation zone during ethylene-induced bean leaf abscission. Phytochem. 35 : 567-572.
- Murashige, T. dan F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth Bioassays With Tobacco Tissue Culture. Physiol Plant. 15 : 473-497.
- Siminis C.I., Kanellis, A.K. dan Roubelakis-angelakis, K.A. 1993. Differences in protein synthesis and peroxidase isoenzymes between recalsitran and regenerating protoplas. Plant. Physiol. 87 : 263 - 270.
- Van Huystee, R.B. dan W.L. Cairns. 1982. Progres and prospect in the use of peroxidase to study all development. Phytochem. 35 : 287-290.
- Yamada, Y. 1977. Callus induction rice, *Oryza sativa* L. Proc. Japan Acad. 43 : 156-160