

## Respon Cekaman NaCl terhadap Morfologi dan kandungan senyawa Fenolik, Flavonoid, Dan aktivitas Antioksidan Pada Bibit Cengkeh (*Syzygium aromaticum.L*)

### *Response of NaCl stress to morphology and content of phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity in Clove seeds (Syzygium aromaticum.L)*

Bagus Tripama<sup>1,3</sup>, Tri Agus Siswoyo<sup>2</sup>, Parawita Dewanti<sup>1\*</sup>, dan Sigit Soeparjono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, University of Jember, East Java, Indonesia

<sup>2</sup>Center of extence Industrial Crop By Tecnology, Jember, East Java, Indonesia

<sup>3</sup>Faculty of Agriculture, University of Muhammadiyah Jember, East Java, Indonesia

\*Email: parawita.faperta@unej.ac.id

#### ABSTRACT

*NaCl stress in plants affects various physiological and biochemical processes that result in reduced biomass production. This study aims to determine the aspects of plant morphological and physiological changes due to NaCl stress with indications of morphological effects on the growth and development of clove plants, as well as the induction of secondary metabolism in survival as indicated by an increase in phenolic bioactive compounds, flavonoids, and single oxygen antioxidant activity. (O<sub>2</sub>), hydroxyl radicals (OH<sup>-</sup>), radicals (O<sup>-2</sup>), and superoxide. The clove seed pot experiment under NaCl stress used a randomized block design with three replications. Data are presented as mean ± standard deviation. The significance of the difference in mean values was tested by analysis of variance, if there was a significant effect, Duncan's Multiple Distance Test (DMRT) was performed. The results of the exploratory research obtained empirical facts that NaCl stress from concentrations (0-500) mM on all morphological parameters affected (a) plant height, (b) number of leaves, stover weight, root weight and shoot/root ratio showed a very significant decrease. . In physiological parameters, phenolic and flavonoid compounds were produced with different levels and antioxidant activity, fluctuating phenolic and flavonoid content, with the optimum value of phenolic content (1.18µg GAE/g) in 292 mM NaCl, and flavonoid content (0.158 g QE/g). ) at 273 mM NaCl. ). The antioxidant activity of DPPH, Hydroxyl activity, Superoxide was affected by the concentration of NaCl*

**Keywords :** Phenolic, Flavonoid, Antioxidant, Clove Plant, NaCl . Stress

**Disubmit :** 24 Maret 2022; **Diterima:** 18 Agustus 2022; **Disetujui:** 22 Februari 2023

## PENDAHULUAN

Pertumbuhan tanaman yang mengandung garam NaCl sebagian besar dibatasi oleh efek osmotik salinitas, terlepas dari kapasitas mereka untuk menghilangkan garam, menghasilkan tingkat pertumbuhan yang rendah dan konduktansi stomata (Fricke, et al, 2004; James, 2008)

Akumulasi garam menyebabkan dehidrasi, gangguan osmosis yang mengakibatkan keracunan dan memperburuk pertumbuhan tanaman, selain itu stres juga menghambat laju penyerapan ion yang menyebabkan homeostasis ionik dan mengganggu osmoregulasi, dengan kata lain akan mengurangi



**Lisensi**

Ciptaan disebarluaskan di bawah Lisensi Creative Commons Atribusi-BerbagiSerupa 4.0 Internasional.

penyerapan ion kalium dan kalsium dan meningkatkan efek bersamaan ion natrium dan klorida tanaman ion meningkat (Senadheera & Maathuis, 2009). ROS (Reactive Oxygen Species) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang sangat reaktif, terdiri dari gugus radikal bebas dan gugus non radikal. Gugus radikal bebas antara lain anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroksil radikal (OH), dan radikal peroksil (RO<sub>2</sub>), sedangkan golongan non radikal adalah hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dan peroksida organik (ROOH) (Halliwell & Whiteman, 2004).

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa stres NaCl menginduksi munculnya ROS dalam sel. Sebagai respon dari ancaman senyawa ROS (Reactive Oxygen Species), tanaman membangun sistem pertahanan dengan mengatur keseimbangan antioksidan-ROS. Sebagai respon terhadap ancaman ROS, tanaman menghasilkan antioksidan yang dapat mendetoksifikasi ROS. Mekanisme ini berkontribusi pada peningkatan toleransi terhadap cekaman garam (Garratt, et al, 2002). Ngxabi et al. (2021) melaporkan bahwa pada kondisi moderat salin konsentrasi NaCl 200 mM tanaman *Trachyandra ciliata* menghasilkan polifenol tertinggi meskipun pada tekstur tanah yang berbeda. Polifenol merupakan senyawa metabolit sekunder tumbuhan, tersebar luas di alam dan telah dipelajari sejak lama. Senyawa tersebut disintesis dalam tanaman melalui jalur metabolisme asam shikimat (dan manolat dalam senyawa flavonoid dan stilbenes), yang merupakan proses yang dikendalikan secara endogen selama diferensiasi perkembangan (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2007), atau yang dapat diatur oleh faktor eksternal seperti cahaya, suhu dan luka. Pada tumbuhan, senyawa ini dapat memainkan peran molekul sinyal, melindungi terhadap sinar UV dan patogen, menarik polinator, merangsang resistensi penyakit dan / atau melindungi terhadap spesies oksigen reaktif yang dihasilkan ketika metabolisme aerobik atau fotosintesis terganggu oleh berbagai tekanan lingkungan seperti stres garam. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dimiliki oleh sebagian besar tumbuhan hijau dan umumnya terakumulasi pada biji, buah, kulit buah, kulit kayu, daun, dan bunga (Miller & Uyar, 1997). Menurut Hertog (1992) disarankan agar setiap hari manusia mengkonsumsi beberapa gram flavonoid, sebagai antimutagenik dan antikarsinogenik, antioksidan, anti peradangan, anti alergi, serta menghambat oksidasi LDL (Low Density Lipoprotein).

Kandungan flavonoid pada daun ginkgo tertinggi dihasilkan pada cekaman NaCl dengan konsentrasi 100 mM NaCl, didukung dengan adanya peningkatan gen-gen terkait dengan enzim untuk sintesis flavonoid seperti PAL, 4CL, FLS, DFR. Kandungan flavonoid berkaitan erat dengan kemampuan toleransi tanaman terhadap cekaman abiotik Xu, Zet al. (2020). Kandungan total fenol dan total flavonoid meningkat di bawah kondisi cekaman garam setelah aplikasi 60 dan 90 mM NaCl pada tanaman *Thymus vulgaris* L (Bistgani, et al, 2019). Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L., famili Myrtaceae) berpotensi diaplikasikan sebagai obat dalam penyakit karies gigi dan penyakit periodontal (Ramadan, Asker, & Tadros, 2013), sebagai pengawet makanan terhadap pembusukan dan bakteri patogen antara lain *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (Friedman, Henika, & Mandrell, 2002), *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, dan *Staphylococcus aureus* (Kalemba & D.; Kunicka, 2003).

Penggunaan biji cengkeh sebagai sumber antioksidan alami telah dilaporkan oleh (Shan et al, 2005). Pengujian aktivitas menunjukkan bahwa hasil cengkeh memiliki kapasitas antioksidan yang kuat dibandingkan tanaman rosemary dan thyme (El-Maati et al., 2016). Beberapa penelitian ilmiah untuk mendapatkan minyak atsiri eugenol yang mudah menguap, yang merupakan salah satu senyawa aktif, yang memiliki efek antioksidan, anestesi dan analgesik, antimikroba, anti inflamasi, antikonvulsan (Zheng & Kenney, 1992); antimutagenik (Jang, Piao, Kim, Kwon, & Park, 2008) obat-obatan dan antifumigan (Ogendo et al, 2008). Sebagai bahan tambahan makanan, eugenol oleh Food and Drug Administration (FDA) menjadi zat yang umumnya dianggap aman (IlhamiGülçin, 2010)

Mengingat pentingnya memahami hubungan efek cekaman cekaman NaCl terhadap morfologi dan biokimia pada tanaman cengkeh, maka perlu dilakukan penelitian dengan pendekatan biokimiawi antioksidan sebagai penanda cekaman NaCl pada tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L). Penelitian ini

bertujuan untuk mengetahui aspek perubahan morfologi dan fisiologis tanaman akibat cekaman NaCl dengan indikasi adanya pengaruh morfologi pada pertumbuhan dan perkembangan tanaman cengkeh, serta adanya induksi metabolisme sekunder dengan indikasi peningkatan senyawa bioaktif fenolik, flavonoid, dan aktivitas antioksidan, radikal hidroksil (OH<sup>-</sup>), radikal (O<sup>-2</sup>), dan superoksida.

## **METODE PENELITIAN**

**Metode.** Penelitian cekaman bibit cengkeh varietas Zanzibar, dilaksanakan di kebun percobaan fakultas pertanian Universitas Jember, Percobaan faktor tunggal dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tiga ulangan. Perlakuan berupa cekaman garam pada bibit cengkeh berumur 5 bulan dengan penyiraman larutan garam NaCl setiap minggu selama satu bulan dengan konsentrasi (0, 100, 200, 300, 400 dan 500) mM NaCl. Frekuensi penyiraman larutan garam NaCl dilakukan sesuai kondisi kapasitas lapang media tanam berupa pasir .

**Bahan Analisis.** Metanol, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub>, Folin Ciocalteu, Quercetin, Asam Gallat, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil DPPH, dan bahan kimia pendukung lainnya. Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah centrifuge, spektrofotometer, inkubator, mikropipet, mortar stumbler, vortex, dan alat pendukung lainnya.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada (Makkar *et al*, 1988), ekstrak organ daun cengkeh, dihaluskan dengan mortar dan diberi metanol 50% dengan perbandingan 1 : 3, kebutuhan disesuaikan dengan kebutuhan analisis. Ekstrak kemudian dimaserasi selama 24 jam pada suhu kamar, setelah 24 jam ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan disimpan dalam freezer untuk analisis total Fenolik, Flavonoid, DPPH, radikal bebas Superoksida Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dan Hidroksil. dalam ekstraksi menggunakan metode yang diusulkan oleh (Makkar *et al*, 1988). Supernatan yang dihasilkan disimpan untuk analisis total fenolik, flavonoid, DPPH, radikal bebas superoksida anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dan Hidroksil.

**Analisis Total Fenolik dan Flavonoid.** Metode pengukuran fenolik total mengacu pada (Taga *et al*, 1984), suplementasi organ daun bibit cengkeh sebanyak 5 L sampel, ditambah 45 L metanol 80%, 1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% dan 50 L Folin Ciocalteu 50%. Larutan tersebut kemudian divortex sampai homogen dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 750 nm. Asam galat digunakan sebagai standar, satuan fenol total dalam mg setara asam galat (µg GAE/g sampel). Pembuatan standar dengan 1 mg GAE dilarutkan ke dalam 1 mL metanol 50%. Standar diambil dari beberapa : 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17,5, 20 (µg GAE/g), nilai yang digunakan sebagai pengganti sampel dan hasil absorbansi digunakan untuk menganalisis nilai Fenolik standar dengan kurva regresi.

Kandungan flavonoid AlCl<sub>3</sub> mengacu pada metode Lamison dan Carnet (1990), dengan beberapa modifikasi. 10 L sampel organ daun cengkeh dicampurkan ke dalam 40 L metanol, 400 L aquadest dan 30 L NaNO<sub>2</sub> 5% kemudian divortex dan diinkubasi selama 5 menit. Larutan homogen ditambahkan 30 L 10% AlCl<sub>3</sub> kemudian diinkubasi selama 6 menit, kemudian 200 L 1 N NaOH dan 240 L aquadest ditambahkan ke dalam larutan dan diukur dengan spektrofotometer absorbansi pada panjang gelombang 415 nm. Quercetin digunakan sebagai standar dengan satuan ekuivalen quercetin (µg QE/g sampel). Pembuatan standar dengan 1 mg QE dilarutkan ke dalam 1 mL metanol 50%. Standar yang diambil dari beberapa nilai 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 (µg QE/g) digunakan sebagai pengganti sampel dan hasil absorbansi digunakan untuk menganalisis nilai standar flavonoid dengan kurva regresi.

**Analisis DPPH.** Penentuan aktifitas antioksidan menggunakan metode menurut (Harmoko *et al.*, 2013) dengan peredaman DPPH. Larutan 0.5 mM DPPH dilarutkan ke dalam larutan ethanol. Supernatan

dari ekstrak organ daun cengkeh, diambil sebanyak konsentrasi yang dibutuhkan dan perhitungan konsentrasi disesuaikan dengan nilai pada pengujian fenolik, serta ditambahkan ethanol sebanyak 700 µL. Kemudian ditambahkan 0.5 mM DPPH sebanyak 200µL pada tabung yang telah berisi sampel dan ethanol. Larutan kemudian divortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan ± 27 0C, dan diusahakan pada tempat yang gelap, Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Nilai presentase aktivitas antioksidan DPPH pada ekstrak sampel ditentukan dengan rumus :

$$\text{Peredaman (\%)} : \frac{\text{Abs. blanko} - \text{Abs. Sampel} \times 100\%}{\text{Abs. Blanko}} \dots \dots \dots (1)$$

**Keterangan :**

1. Abs. Blanko : absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel
2. Abs. Sampel : absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan sampel.

**Analisis Superoksida.** Analisis superoksida menggunakan metode (Visscher, Yang, & Goddard, 2010), supernatan organ daun cengkeh diambil sebanyak 200 L kemudian ditambahkan 1,7 mL Tris-HCl 50 mM buffer (pH 8,2) pada tabung reaksi yang berbeda. 10 mM Pyogalol (dalam 10 mM HCl) ditambahkan sebanyak 100 L dan diinkubasi selama 10 menit. Kemiringan reaksi ditentukan dari autooksidasi pirogalol selama 4 menit dengan panjang gelombang 320 nm menggunakan spektrofotometer. Persentase serapan radikal anion superoksida menggunakan ekstrak organ generatif cengkeh dibandingkan dengan penghambatan menggunakan 0,1 g / L Vitamin C.

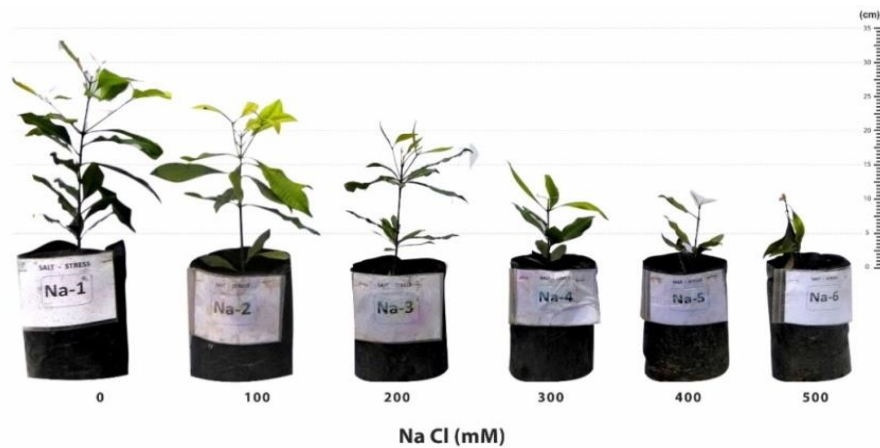
**Analisis Hidroksil.** Penghambatan radikal hidroksil menggunakan metode (Halliwell & Whiteman, 2004), terdiri dari 50 mL 2-deoxy-D-ribose 28 mM (dalam 20 mM dapar fosfat, pH 7,4) ditambahkan supernatan organ generatif cengkeh, 150µL, 100µL EDTA 1 mM, 100 l FeCl<sub>3</sub> 10 mM, 50µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM dan 50 l asam askorbat 1 mM dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berbeda untuk ekstrak yang berbeda dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 ° C. Lima ratus l ATB 1% dan 500µl ATC 2,8% ditambahkan ke tabung mikro kemudian larutan divortex dan diinkubasi selama 20 menit pada 1000C untuk menghasilkan warna merah muda. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 532 nm menggunakan spektrofotometer atau pembaca pelat mikro. Persen (%) penghambatan radikal hidroksil pada setiap fase organ generatif dibandingkan dengan penghambatan menggunakan 0,1 g/L Vitamin C.

**Analisis Statistik.** Percobaan pot bibit cengkeh yang diperlakukan dengan cekaman NaCl, menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan tiga ulangan. Data disajikan sebagai mean ± standar deviasi. Signifikansi perbedaan antara nilai rata-rata diuji dengan Analisis varian, jika ada pengaruh yang signifikan maka Duncan Multiple Range Test (DMRT).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Pengaruh NaCl terhadap Morfologi.** Cekaman salinitas signifikan menghambat pertumbuhan bibit cengkeh meliputi tinggi tanaman, jumlah daun, berat brangkasan, dan berat akar (Gambar 2). Tinggi tanaman menurun sejalan dengan peningkatan konsentrasi NaCl dan penghambatan yang signifikan terdapat pada perlakuan 200 mM (Gambar 1). Pada cekaman salinitas dengan konsentrasi NaCl 300 mM, beberapa karakter morfologi jumlah daun, berat tajuk, dan berat akar, signifikan berkurang dibandingkan dengan morfologi bibit cengkeh pada kondisi normal (kontrol), dan berpengaruh pada penurunan berat brangkasan. Sementara pada rasio pucuk/akar, menunjukkan nilai tidak signifikan pada semua konsentrasi perlakuan cekaman NaCl, menjelaskan penghambatan pertumbuhan yang sama pada bagian tajuk dan akar tanaman. Studi sebelumnya melaporkan bahwa penghambatan pertumbuhan bibit ginko (tajuk dan akar) yang

signifikan terjadi pada konsentrasi 300 mM. Penurunan kandungan air jaringan dan klorofil tanaman ginkgo secara signifikan terjadi pada cekaman NaCl dengan konsentrasi 200 mM sehingga berpengaruh terhadap proses fisiologis terutama asimilasi karbon oleh tanaman (Xu et al., 2020). Pertumbuhan tanaman pada kondisi salinitas tinggi dibatasi oleh efek tekanan osmotik, dengan sebagian energi di alokasikan tanaman untuk mengatur keseimbangan ion dalam jaringan, menghambat aktivitas fotosintesis karena penurunan konduktansi stomata, menekan pembelahan dan pemanjangan sel sehingga menghasilkan laju pertumbuhan yang rendah (Fricke et al., 2004; Zelm et al., 2020; Zhao et al., 2021).



Gambar 1. Cekaman NaCl Terhadap Morfologi Stadium Bibit Cengkeh.

Uji Duncan taraf 5 % Cekaman NaCl Terhadap Morfologi dilakukan pada fase Bibit tanaman Cengkeh. meliputi: (a) Tinggi Tanaman, (b) Jumlah Daun, (c) Berat Kering, (d): Berat Tajuk, (e) Berat Akar, (f) Rasio berat (Tajuk/Akar) dapat dilihat di table 1.

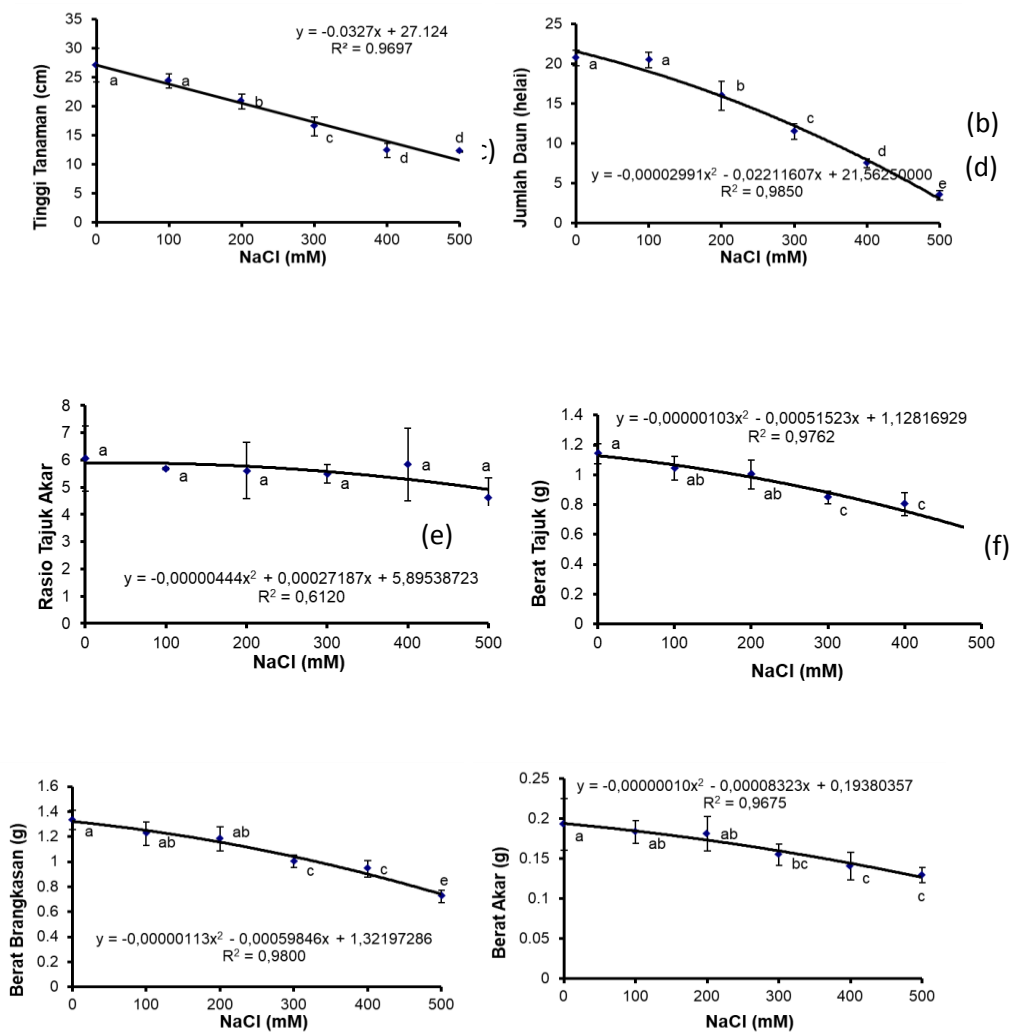
Tabel 1. Pengaruh cekaman NaCl terhadap karakteristik Morfologi Bibit Cengkeh

Cekaman NaCl	Tinggi Tanaman (cm)	Jumlah Daun (helai)	Berat Tajuk (g)	Berat Akar (g)	Rasio Tajuk Akar	Berat Brangkasan (g)
0 mM	27,13 ± 2,87 a	20,75 ± 0,96 a	1,14 ± 0,07 a	0,19 ± 0,03 a	6,06 ± 1,20 a	1,33 ± 0,08 a
400 mM	24,43 ± 1,21 a	20,50 ± 1,00 a	1,04 ± 0,08 ab	0,18 ± 0,01 ab	5,84 ± 0,04 a	1,22 ± 0,09 ab
100 mM	20,85 ± 1,29 b	16,00 ± 1,83 b	1,00 ± 0,10 ab	0,18 ± 0,02 ab	5,69 ± 1,03 a	1,18 ± 0,10 ab
200 mM	16,55 ± 1,59 c	11,50 ± 1,00 c	0,85 ± 0,04 c	0,16 ± 0,01 bc	5,62 ± 0,34 a	1,00 ± 0,05 c
300 mM	12,43 ± 1,21 d	7,50 ± 0,58 d	0,80 ± 0,08 c	0,14 ± 0,02 c	5,49 ± 1,33 a	0,94 ± 0,07 c
500 mM	12,28 ± 0,13 d	3,50 ± 0,58 e	0,59 ± 0,05 d	0,13 ± 0,01 c	4,64 ± 0,72 a	0,72 ± 0,05 d

Keterangan: rata-rata yang diikuti notasi yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada Uji Duncan taraf 5%

Konsentrasi garam yang tinggi mempengaruhi tanaman dalam dua cara: mengganggu kapasitas akar dalam penyerapan air dan nutrisi karena terjadi peningkatan tekanan osmotik dan penurunan potensial air tanah, dan menyebabkan penghambatan dan/atau perubahan berbagai proses fisiologis dan biokimia (Hasegawa et al., 2000; Gao et al., 2017). Bina & Bostani (2017) melaporkan bahwa cengkeh tergolong tanaman obat yang digolongkan ketahanan moderat terhadap cekaman salinitas, dengan penurunan pertumbuhan tunas dan panjang akar yang signifikan pada konsentrasi NaCl 200 mM. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada hasil penelitian ini dengan penurunan tinggi tanaman dan jumlah daun secara signifikan pada konsentrasi NaCl 200 mM (Gambar 2a, 2b). Pertumbuhan tunas fase awal vegetatif tanaman cengkeh sangat dipengaruhi oleh salinitas dibandingkan dengan perkembangan akar (Bina dan Bostani, 2017). Respon yang sama ditunjukkan pada bibit cengkeh hasil penelitian ini, yaitu penurunan tinggi tanaman dan jumlah daun secara signifikan setelah peningkatan konsentrasi NaCl 200 mM, dan pertumbuhan semakin

dihambat seiring dengan peningkatan konsentrasi NaCl. Sementara penekanan pertumbuhan akar secara signifikan terjadi dimulai pada konsentrasi 300 mM, dan relatif memiliki nilai berat akar yang konstan sampai pada cekaman salinitas pada konsentrasi NaCl 500 mM (Gambar 2a, 2b, 2f). Hasil ini juga didukung dengan nilai kemiringan (*slope*) dari regresi antara konsentrasi NaCl dengan tinggi tanaman dan jumlah daun (-0,03 dan -0,02) lebih besar dibandingkan dengan berat akar (-0,0008). Penurunan tinggi tanaman dan jumlah daun mempengaruhi berat tajuk yang signifikan pada konsentrasi NaCl 300 mM. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh (Amarin et al., 2020), bahwa penurunan tinggi tanaman berpengaruh kuat terhadap berat segar tanaman 2 varietas cengkeh pada konsentrasi NaCl diatas 300 mM. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa batas minimal tanaman cengkeh dapat mentolerir cekaman salinitas (NaCl) adalah pada konsentrasi 200 mM, dan pertumbuhan bibit cengkeh akan terhambat apabila terpapar kondisi salinitas pada konsentrasi melebihi dari 200 mM.



Gambar 2. Pengaruh Cekaman NaCl terhadap Morfologi Bibit Cengkeh (a) Tinggi Tanaman, (b) Jumlah Daun, (c) Rasio Tajuk Akar, (d): Berat Tajuk, (e) Berat Brangkasan, (f) Berat Akar.

Potensial osmotik dan potensial air menjadi negatif dengan adanya peningkatan kadar garam, kondisi ini memicu peningkatan tekanan turgor. Hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pada konsentrasi garam yang tinggi, tanaman akan mengakumulasi Na dan Cl ke dalam daun. Konduktivitas hidrolik akar menurunkan jumlah air yang mengalir dari akar ke daun, akibat cekaman air pada jaringan daun (Mulry,

Hanson, & Dudle, 2015). BandhuDas (2005) melaporkan adanya akumulasi polifenol di *Bruguiera parviflora* sebagai efek adanya cekaman salinitas. Peningkatan polifenol di daun pada kondisi salinitas telah diamati pada *Brassica campestris* (Singh & Kumar, 2006). Peningkatan kandungan polifenol pada tingkat salinitas tinggi, telah menyebabkan akumulasi metabolit sekunder pada spesies tanaman percobaan untuk mentolerir peningkatan kadar salinitas.

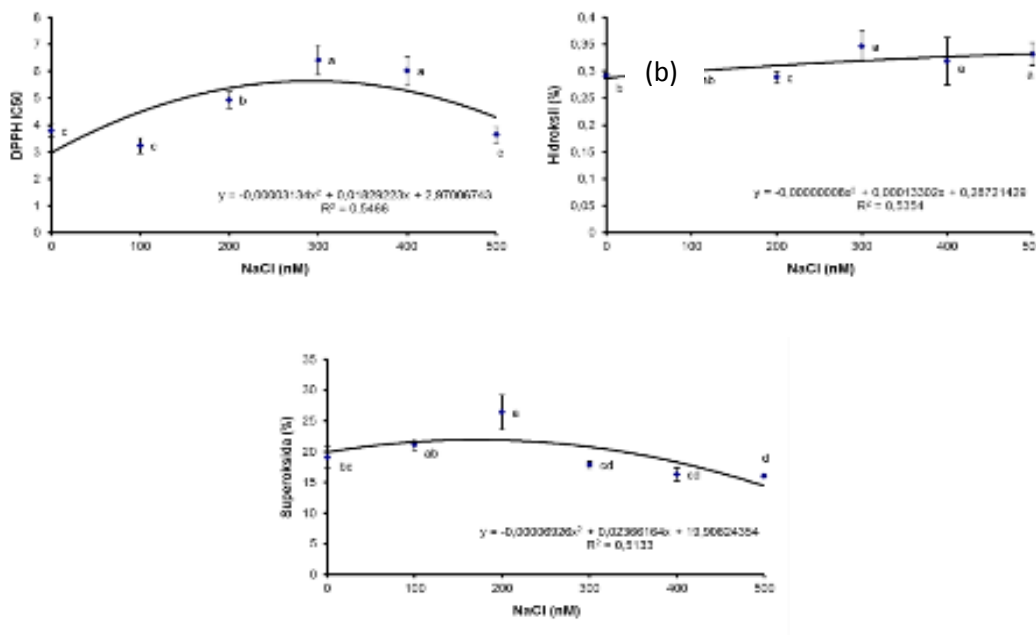
Uji Duncan taraf 5 % Cekaman NaCl Terhadap Perendaman Anion Bibit Cengkeh dapat di lihat pada table 2.

Tabel 2. Pengaruh cekaman NaCl terhadap Perendaman Anion Bibit Cengkeh

Cekaman NaCl	DPPH	Hidroksil	Superox
0 mM	3,78 ± 0,22 c	0,29 ± 0,00 b	19,08 ± 1,81 bc
400 mM	3,22 ± 0,29 c	0,30 ± 0,02 ab	21,17 ± 0,91 ab
100 mM	4,93 ± 0,31 b	0,29 ± 0,01 c	26,43 ± 2,83 a
200 mM	6,42 ± 0,56 a	0,35 ± 0,03 a	17,83 ± 0,60 cd
300 mM	6,02 ± 0,52 a	0,32 ± 0,04 a	16,29 ± 1,10 cd
500 mM	3,64 ± 0,30 c	0,33 ± 0,02 a	16,05 ± 0,20 d

Keterangan: rata-rata yang diikuti notasi yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada Uji Duncan taraf 5%

Perlakuan cekaman NaCl pada tanaman cengkeh menghasilkan kandungan fenol yang berfluktuasi, jika dibandingkan dengan kontrol pada 0,00 mM (0,35 g GAE/g), hampir semua perlakuan NaCl meningkatkan kandungan fenolik yang bervariasi. Pada gambar 21. Pengaruh cekaman NaCl dari konsentrasi 0-500 mM pada peredaman anion (a).DPPH (1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl), (b) Superoxide(O•-2), (c).Hidroksil (OH•). Perlakuan cekaman NaCl pada tanaman cengkeh dengan menggunakan analisis regresi memperlihatkan nilai optimum aktivitas anion Hidroksil (OH•), pada cekaman NaCl sebesar 831 mM, nilai yang ekstrim ini diduga karena secara visual pada gambar menunjukkan adanya kecenderungan garis regresi yang linier, sehingga tidak dapat ditentukan nilai optimumnya, Nilai DPPH optimum pada cekaman NaCl dosis 292 mM dengan besar pengaruh 54,66% dan Superoxide(O•-2) sebesar 171 mM dengan besar pengaruh cekaman NaCl sebesar 51,33%.



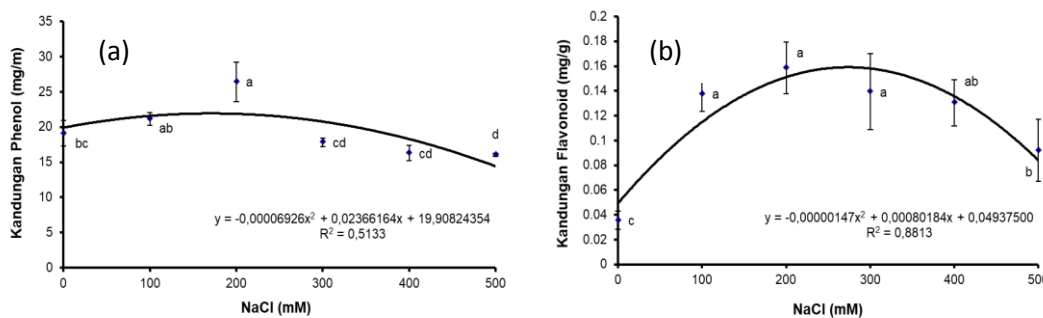
Gambar 3 Pengaruh Stres Garam NaCl pada peredaman anion (a).DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), (b) Hidroksil (OH•), (c). Superoxide(O•-2)

Uji Duncan taraf 5 % Cekaman NaCl Terhadap Total Fenolik dan Flavonoid Bibit Cengkeh dapat di lihat pada table 3.

Tabel 3. Pengaruh cekaman NaCl terhadap Total Fenolik dan Flavonoid

Cekaman NaCl	Kandungan Fenolik	Kandungan Flavonoid
0 mM	0,35 ± 0,02 e	0,04 ± 0,01 c
400 mM	0,60 ± 0,02 d	0,14 ± 0,01 a
100 mM	1,18 ± 0,14 a	0,16 ± 0,02 a
200 mM	0,79 ± 0,03 bc	0,14 ± 0,03 a
300 mM	0,85 ± 0,03 b	0,13 ± 0,02 ab
500 mM	0,71 ± 0,02 cd	0,09 ± 0,03 b

Keterangan: rata-rata yang diikuti notasi yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada Uji Duncan taraf 5%



Gambar 3. Pengaruh NaCl terhadap Total Phenolic dan Flavonoid

Pada Gambar 3. Perlakuan cekaman NaCl pada tanaman cengkeh dengan menggunakan analisis regresi memperlihatkan kandungan fenol yang berfluktuasi, jika dibandingkan dengan kontrol pada 0,00 mM (0,35 g GAE/g), hampir semua perlakuan NaCl meningkatkan kandungan fenolik yang bervariasi, Terhadap kandungan fenol terjadi nilai optimum pada cekaman NaCl 292 mM dan cekaman NaCl memengaruhi kandungan fenol sebesar 68,59%. Terhadap kandungan flavonoid terjadi nilai optimum pada cekaman NaCl 273 mM dan cekaman NaCl memengaruhi kandungan flavonoid sebesar 88,13%.

Stres osmotik pada tahap awal menyebabkan berbagai perubahan fisiologis, seperti pecahnya selaput ketuban, ketidakseimbangan nutrisi, gangguan kemampuan detoksifikasi Reactive Oxygen Species (ROS), penurunan aktivitas fotosintesis dan penurunan celah stomata. Stres salinitas juga disebut stres hiperionik. Salah satu dampak kerusakan akibat cekaman salinitas adalah akumulasi ion Na dan Cl pada jaringan tanaman yang terpapar langsung dengan tanah dengan konsentrasi NaCl yang tinggi (Gupta & Huang, 2014). Perlakuan cekaman NaCl pada tanaman cengkeh menghasilkan kandungan fenol yang berfluktuasi, jika dibandingkan dengan kontrol pada 0,00 mM (0,35 g GAE/g), hampir semua perlakuan NaCl meningkatkan kandungan fenolik yang bervariasi, nilai optimum diperoleh pada konsentrasi NaCl 200 mM (1,18µg GAE/g), Perlakuan cekaman NaCl pada tanaman cengkeh menghasilkan kandungan flavonoid yang fluktuatif, jika dibandingkan dengan kontrol pada 0,00 mM (0,036 (µg QE/g), hampir semua perlakuan NaCl meningkatkan Flavonoid yang bervariasi kandungan, nilai optimum diperoleh pada konsentrasi NaCl 200 mM (0,158 g QE/g) gambar(3).

Radikal hidroksil merupakan radikal bebas yang sangat reaktif yang terbentuk dalam sistem biologis dan telah berimplikasi sebagai spesies yang sangat merusak dalam patologi radikal bebas, yang mampu



menghancurkan hampir semua molekul yang ditemukan dalam sel hidup. Di antara radikal oksigen, itu adalah radikal paling reaktif yang menyebabkan kerusakan parah pada biomolekul yang berdekatan (Sakanaka, et al, 2005). Radikal hidroksil memiliki kapasitas untuk bergabung dengan nukleosida dalam DNA dan menyebabkan kerusakan untai, yang berkontribusi terhadap karsinogenesis, mutagenesis, dan sitotoksitas (Moskovitz, et al, 2002). Selain itu, spesies ini dianggap sebagai inisiator cepat dari proses peroksidasi lipid karena abstraksi atom hidrogen dari asam lemak tak jenuh (Rollet-Labelle E, et al, 1998).

Radikal hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ) Molekul yang sangat reaktif telah disebut sebagai agen perusak dinding sel, jika diproduksi di apoplas, mampu menyerang polisakarida dinding sel dan menyebabkan kerusakan pada struktur penahan beban, proses ini diperkirakan terjadi di berbagai proses, seperti perkecambahan biji (Bailly, 2004) dan pertumbuhan bibit (Schopfer, Plachy, & Frahy, 2001). Stres garam meningkatkan laju produksi AOS seperti radikal superoksida ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radikal hidroksil ( $\text{OH}$ ), radikal alkoxy ( $\text{RO}$ ) dan pembentukan oksigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) melalui peningkatan kebocoran elektron ke oksigen. Telah diketahui bahwa spesies oksigen aktif sitotoksik (AOS), yang juga dihasilkan selama proses metabolisme di mitokondria dan peroksisom, dapat merusak metabolisme normal melalui kerusakan oksidatif lipid, protein, dan asam nukleat (Wang et al., 2005).

Aktivitas antioksidan DPPH, Persentase Hidroksil dan Superoksida pada masing-masing konsentrasi daun cengkeh ditunjukkan pada Gambar 4. Peningkatan kandungan Na yang disebabkan oleh peningkatan konsentrasi NaCl lebih besar pada akar, seperti yang telah diamati oleh Bhatti & Sarwar (1997) menunjukkan translokasi yang lebih lambat dari akar ke tunas. Pada tanaman kacang-kacangan, penurunan yang sama dalam tingkat translokasi dianggap berasal dari mekanisme pengaturan akar, yang mencegah translokasi penyerapan Na berlebihan dari akar ke pucuk. Selain itu, tampaknya pada beras, toleransi garam dikaitkan dengan penurunan pengangkutan Na ke pucuk. Jadi dapat disimpulkan bahwa kemampuan tanaman untuk menahan pengaruh salinitas terletak pada kemampuannya untuk membatasi, atau mencegah, masuknya Na ke dalam pucuk.

Pergo & Ishii-Iwamoto (2011) melaporkan bahwa aktivitas enzim antioksidan meningkat setelah perkecambahan, terutama pada akar primer. Superoksida dismutase, katalase, dan guaicol peroksidase merupakan enzim penting yang terlibat dalam netralisasi ROS, karena memiliki tingkat aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim lain, seperti askorbat peroksidase dan glutathion reduktase. Aktivitas SOD, CAT, dan POD terjadi pada embrio, bersama dengan respirasi insensitif KCN yang signifikan, aktivitas ini menunjukkan bahwa produksi spesies oksigen reaktif dimulai segera setelah respirasi mitokondria dilanjutkan selama penyerapan benih. KCN-insensitif laju respirasi untuk oksigen yang diubah menjadi superoksida dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ((Susana Puntarulo, 1988). Anion superoksida adalah reduksi oksigen molekuler yang dibuat dengan menerima satu elektron, yaitu radikal bebas awal yang terbentuk dari sistem transpor elektron mitokondria. Mitokondria menghasilkan energi menggunakan reaksi berantai 4 elektron, mengurangi oksigen ke udara. Beberapa elektron yang dilepaskan dari reaksi berantai mitokondria bereaksi langsung dengan oksigen dan membentuk anion superoksida (Lee, Koo, & Min, 2004). Mekanisme reduksi oksigen adalah pembentukan radikal anion superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil, sesuai dengan mekanisme atau reduksi masing-masing satu, dua dan tiga elektron (SIES, 1997) ini memainkan peran penting dalam sistem kehidupan.

Secara bersama-sama, efek ini menurunkan pertumbuhan, perkembangan, dan kelangsungan hidup tanaman. Pertumbuhan tanaman yang mengandung garam sebagian besar dibatasi oleh efek osmotik salinitas, terlepas dari kapasitas mereka untuk menghilangkan garam, menghasilkan tingkat pertumbuhan yang rendah dan konduktansi stomata (Wieland Fricke et al., 2004) Beberapa peneliti melaporkan peningkatan polifenol pada salinitas tinggi, menunjukkan adanya induksi metabolik sekunder, dalam menghadapi lingkungan salin (Kate, 2008). (BandhuDas, 2005) melaporkan adanya akumulasi polifenol di *Bruguiera parviflora* sebagai salinitas meningkat. Peningkatan polifenol pada daun pada kondisi salinitas

NaCl telah diamati pada *Brassica campastris* (Singh & Kumar, 2006). Peningkatan kandungan polifenol pada tingkat salinitas tinggi, telah menyebabkan akumulasi metabolit sekunder pada spesies tanaman percobaan untuk mentolerir peningkatan kadar salinitas.

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian eksplorasi diperoleh fakta empiris bahwa cekaman NaCl dari konsentrasi (0-500) mM pada semua parameter morfologi berpengaruh terhadap (a) tinggi tanaman, (b) jumlah daun, berat brangkasan, berat akar dan rasio pucuk/akar menunjukkan penurunan yang sangat nyata. Pada parameter fisiologi, dihasilkan senyawa fenolik dan flavonoid dengan kadar dan aktivitas antioksidan yang berbeda, kandungan total Fenolik dan Flavonoid berfluktuasi, dengan nilai optimum kandungan Phenolik (1,18µg GAE/g) pada NaCl 292 mM, dan Flavonoid (0,158 g QE/g) pada NaCl 273 mM. Aktivitas antioksidan DPPH, aktivitas Hidroksil, Superoksida juga turut dipengaruhi oleh konsentrasi garam NaCl. Jaringan daun cengkeh dapat digunakan sebagai sumber senyawa antioksidan fenolik, flavonoid di masa depan.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dekan Fakultas Pertanian Unej, Kaprodi Program Doktor Ilmu Pertanian, para Promotor, ko-promotor dan rekan-rekan di fakultas Pertanian Universitas Jember, dan CDAST Universitas Jember, serta kolega staf fakultas pertanian Universitas Muhamadiyah Jember

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Abo El-Maati, M. F., Labib, S. M., Al-Gaby, A. M. A., & Ramadan, M. F. (2016). Zagazig Journal of Agricultural Biochemistry and its Application 1685 Antioxidant And Antibacterial Properties Of Different Extracts Of Garden Cress (*Lepidium sativum* L.). 43(5), 1685–1698.
- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14(2), 93–107. <https://doi.org/10.1079/ssr2004159>
- BandhuDas, A. K. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–349.
- Bhatti, & Sarwar. (1997). Colorectal Carcinoma An Analytical Study of 104 Cases. 3(1&2). <https://doi.org/https://doi.org/10.21649/akemu.v3i1&2.3453>
- Bin Shan , Yizhong Z Cai, Mei Sun, H. C. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. <https://doi.org/10.1021/jf051513y>.
- Bina, F., & Bostani, A. (2017). Effect of Salinity (NaCl) stress on germination and early seedling growth of three medicinal plant species. *International Quarterly Journal of Life Science*, 4(3), 77–83.
- Bistgani, Z., Hashemi, M., DaCosta, M., Cracker, L., & Maggi, F. (2019). Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 5(3), 311–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.055>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2007). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, (April 2016), 1–24. <https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch1>

- Fricke, W, Akhiyarova, G., & Veselov, D. (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55(399), 1115–1123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jxb/erh117>
- Fricke, Wieland, Akhiyarova, G., Veselov, D., & Kudoyarova, G. (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55(399), 1115–1123. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh117>
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1545–1560. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1545>
- G Q Zheng , P M Kenney, L. K. L. (1992). Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. <https://doi.org/10.1021/np50085a029>
- Garratt 1, Basangouda S Janagoudar, Kenneth C Lowe, Paul Anthony, J Brian Power, M. R. D. (2002). Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00838-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00838-9)
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). 701596. *International Journal of Genomics*, 2014.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Harinder Paul S. Makkar, Rajinder K. Dawra, B. S. (1988). Determination of Both Tannin and Protein in a Tannin-Protein Complex. *Agricultural and Food Chemistry*, 36(3), 523–525.
- Harmoko, R., Fanata, W. I. D., Yoo, J. Y., Ko, K. S., Rim, Y. G., Uddin, M. N., ... Lee, K. O. (2013). RNA-dependent RNA polymerase 6 is required for efficient hpRNA-induced gene silencing in plants. *Molecules and Cells*, 35(3), 202–209. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-2203-2>
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology*, 51(July), 463–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
- Hertog. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Agr Food*, 40, 2379–2383.
- İlhamiGülçin. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 215.
- J.O.OgendoaM.et al. (2008). Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. *Stored Products Research*, 44(4), 329.
- James. (2008). *Principles of Science For Nurse*. California: Blackwell Publishing.
- Jang, M. H., Piao, X. L., Kim, J. M., Kwon, S. W., & Park, J. H. (2008). Inhibition of cholinesterase and amyloid- $\beta$  aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phytotherapy Research*, 22(4), 544–549. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Kalemba, D.; Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. 10, 10. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>

- Kate. (2008). Physiological and biochemical studies in some medicinal plants: *Tribulus terrestris* L. and *Pedalium murex* L. Shivaji University.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
- Miller, D. J., & Uyar, H. S. (1997). A mixture of experts classifier with learning based on both labelled and unlabelled data. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 571–577.
- Moskovitz, J., Yim, M. Bin, & Chock, P. B. (2002). Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 354–359.
- Mulry, K. R., Hanson, B. A., & Dudle, D. A. (2015). Alternative strategies in response to saline stress in two varieties of *Portulaca oleracea* (Purslane). *PLoS ONE*, 10(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138723>
- Pergo, É. M., & Ishii-Iwamoto, E. L. (2011). Changes in Energy Metabolism and Antioxidant Defense Systems During Seed Germination of the Weed Species *Ipomoea triloba* L. and the Responses to Allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 37(5), 500–513. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9945-0>
- Ramadan, M. F., Asker, & Tadros, M. (2013). Lipid profile. Antiradical power and antimicrobial properties of *Syzgium aromaticum* oil. 64(5), 509–520.
- Rollet-Labelle E, Grange MJ, Elbim C, Marquetty C, Gougerot-Pocidallo MA, P. C. (1998). Hydroxyl Radical as a Potential Intracellular Mediator of Polymorphonuclear Neutrophil Apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(4), 563–572. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00292-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00292-x)
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., & Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 4(89), 569–575. <https://doi.org/DOI:10.1016/j.foodchem.2004.03.013>
- Schopfer, P., Plachy, C., & Frahry, G. (2001). Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology*, 125(4), 1591–1602. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1591>
- Senadheera, P., & Maathuis, F. J. M. (2009). Differentially regulated kinases and phosphatases in roots may contribute to inter-cultivar difference in rice salinity tolerance. *Plant Signaling and Behavior*, 4(12), 10–13. <https://doi.org/10.4161/psb.4.12.9969>
- SIES, H. (1997). Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress Reaction of Nitric Oxide With Superoxide: *Experimental Physiology*, 13(December 1995), 305–316.
- Singh, S., & Kumar, M. (2006). Heavy Metal Load of Soil, Water and Vegetables in Peri-Urban Delhi. *Environmental Monitoring and Assessment*, (120), 79–91. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/s10661-005-9050-3>
- Susana Puntarulo, R. A. S. and A. B. (1988). Hydrogen Peroxide Metabolism in Soybean Embryonic Axes at the Onset of Germination. *Plant Physiology*, 86(2), 626–630.
- Taga, M. S.; Miller, E. E.; Pratt, D. E. (1984). hia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *The American Oil Chemists*, 61, 928–931. <https://doi.org/10.1007/BF02542169>

- Visscher, P. M., Yang, J., & Goddard, M. E. (2010). A commentary on “common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height” by Yang et al. (2010). *Twin Research and Human Genetics*, 13(6), 517–524. <https://doi.org/10.1375/twin.13.6.517>
- Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R., & Fuchigami, L. (2005). Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(2), 167–173. <https://doi.org/10.21273/jashs.130.2.167>