

**PERUBAHAN ULTRASTRUKTUR DAN KEMAMPUAN  
MERESTORASI BINTIL AKAR TANAMAN CLOVER PUTIH  
(*Trifolium repens* L.) AKIBAT DEFOLIASI BERAT <sup>1)</sup>**

**(Ultrastructural Change In White Clover (*Trifolium repens* L.) Root Nodules and It's  
Restoration Capacity Subjected to Heavy Defoliation).**

**Djoko Muljanto<sup>2)</sup>**

**ABSTRACT**

The experiment was conducted at the controlled growth chamber with the artificial light of 10 mercury HQI 400W as a source of  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{minute}^{-1}$  photons. Duration of a day is 16 hours with the temperature of  $22^{\circ}\text{C}$  in the day and  $18^{\circ}\text{C}$  in the night. The objective of the experiment was to study the change and the restoration capacity of the ultrastructure root nodules after defoliation. Defoliation was applied 2 months after germination by two ways, namely : 1. light defoliation (cutting the petiole and 1 cm from the stolon left); 2. heavy defoliation (cutting of all the stolon and petiole, and 1 cm from the basal left), and 3 without defoliation as a control.

Results of the experiment showed that there was no significant different between the light defoliation and the control on the ultrastructure of root nodules. However, the polysaccharide content was lower than the control. The heavy defoliation induced the bacteroid degradation of root nodules and the modification of carbohydrate metabolism in the root nodules. White clover has a capacity to restore the bacteroid fixatrice zone more efficient due to the regrowing of the apical part of the root nodules by new infections of rhizobium bacteria. The restoration of the efficient  $\text{N}_2$  fixation system caused the height adaptation to heavy defoliation in the field.

Key words : White clover (*Trifolium repens* L.), heavy defoliation, restoration capacity, bacteroid fixatrice zone, meristematic zone.

**INTISARI**

Penelitian ini dilaksanakan di ruang Ecotron dengan pencahayaan 10 buah lampu Merkuri HQI 400 W, yang dapat memberikan foton sebesar  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{detik}^{-1}$ . Panjang hari 16 jam dengan suhu siang  $22^{\circ}\text{C}$  dan suhu malam  $18^{\circ}\text{C}$ . Tujuan penelitian adalah untuk mempelajari perubahan ultrastruktur jaringan bintil akar dan daya merestorasi setelah tanaman dipangkas berat pada tajuknya. Pemangkas dilakukan setelah 2 bulan dengan cara : pangkas ringan, yaitu memotong tangkai daun dan disisakan 1 cm di atas stolon; pangkas berat, yaitu memotong seluruh tajuknya (stolon dan tangkai daun) dan disisakan 1 cm dari pangkal tanaman; dan tanpa pemangkas sebagai kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, pemangkas ringan tidak menunjukkan perubahan ultrastruktur bintil akar, walaupun kandungan polisakarida pada jaringan bintil akar menurun. Pemangkas berat menyebabkan degradasi bakteroid penyemat  $\text{N}_2$  dan terjadi modifikasi metabolisme karbohidrat dalam bintil akar tanaman. Tanaman clover putih mempunyai kemampuan untuk memperbaiki bagian yang melakukan fiksasi  $\text{N}_2$  lebih efisien sebagai akibat terjadinya pertumbuhan kembali bagian apikal bintil akar yang ada, dan karena adanya infeksi baru bakteri rhizobium. Mekanisme ini menyebabkan terjadinya perbaikan sistem fiksasi  $\text{N}_2$  kembali, yang memungkinkan tanaman tersebut mempunyai adaptasi tinggi terhadap pemangkas berat di lapangan.

Kata-kata kunci : Clover putih (*Trifolium repens* L.), pemangkas berat, kemampuan merestorasi, zone bakteroid penyemat  $\text{N}_2$ , zone meristematis.

1) Sebagian thesis Doktor dalam bidang Agronomi di INPL Perancis

2) Dosen Fakultas Pertanian UGM

## PENGANTAR

Aktivitas penyematan N<sub>2</sub> oleh bintil akar tanaman clover putih akan menurun setelah dipangkas bagian tajuknya. Aktivitas tersebut akan naik kembali 10 hari setelah terjadi defoliiasi atau setelah proses fotosintesis menjadi normal kembali (Muljanto, 1994). Terbatasnya informasi mengenai pengaruh pemangkasan berat pada tanaman clover terhadap perubahan yang terjadi baik morfologi bintil akar, ultrastruktur maupun aktivitas enzim nitrogenase, perlu adanya penelitian lebih lanjut. Dengan dasar pertimbangan tersebut, peneliti mengamati perubahan ultrastruktur bintil akar setelah mengalami cekaman transpor asimilat sebagai akibat pemangkasan berat pada bagian tajuknya. Dari perlakuan yang diberikan, kemudian diamati beberapa hal, antara lain : 1. Perubahan struktur jaringan bintil akar dan struktur bakteroid pada zone fiksasi N<sub>2</sub>; 2. Perubahan kandungan polisakarida dalam jaringan bintil akar; 3. Evolusi histologi bintil akar; 4. Perubahan jaringan korteks bintil akar tanaman.

## BAHAN DAN METODE PENELITIAN

### 1. Bahan Penelitian

Varietas clover yang dipakai adalah HUIA (tipe *Hollandicum*) yang diinokulasi dengan bakteri rhizobium dari Pusat Penelitian di Bouzule, Perancis (Muljanto, 1994).

### 2. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di dalam Ecotron, di Laboratoire de 1 Ecophysologie vegetale - INPL, Nancy, Perancis. Pencahayaan digunakan 10 lampu merkuri HQI 400 W yang dapat memberikan foton sebesar  $300 \mu \text{ mol. m}^{-2} \text{ detik}^{-1}$ . Panjang hari 16 jam. Suhu siang hari 22°C dan suhu malam hari 18°C. Tanaman ditumbuhkan di media tanah dalam rhizotron dengan kandungan lengas 80 persen dari kapasitas lapangan. Larutan Makanan WCH (Wood *et al.*, 1983) diberikan setiap hari bersamaan dengan penyiraman tanaman.

Tujuan penelitian adalah untuk mempelajari perubahan ultrastruktur jaringan bintil akar dan kemampuan merestorasi setelah dipangkas berat pada tajuknya.

Pemangkasan dilakukan setelah 2 bulan dengan cara : 1. pangkas ringan, yaitu memotong

tangkai daun dan disisakan 1 cm di atas stolon; 2. pangkas berat, yaitu memotong seluruh tajuknya (stolon dan tangkai daun) dan disisakan 1 cm dari pangkal tanaman; dan 3 tanpa pemangkasan sebagai kontrolnya.

Pengamatan histologi bintil akar dilaksanakan dengan menggunakan mikroskopi optik dan mikroskopi elektronik transmisi.

Mikroskopi optik, fiksasi preparat dengan menggunakan Navachine, kemudian diinklusi dengan parafin yang dilakukan setelah dehidrasi dengan alkohol 10<sup>o</sup>-100<sup>o</sup>. Irisan tipis (7,5  $\mu\text{m}$ ) diperoleh dengan menggunakan mikrotom. Pewarnaan untuk inti sel dan bagian sel yang lain digunakan hematoxyline, untuk sitoplasma dengan eosin dan untuk dinding sel dengan blue toluidine. Pengamatan kandungan polisakarida dalam jaringan bintil akar menggunakan metoda PAS (Periodic Acid Schiff Reagent).

Mikroskopi elektronik transmisi; fiksasi dilakukan dengan larutan Osmium tetra oksida (OsO<sub>4</sub>). Irisan tipis (80-100 nm) dihasilkan dengan menggunakan ultratome otomatis LKB 480 1A dengan pisau diamon, atau dengan ultramicrotome Reichert "Ultra-cut" OM-U2 dengan cara mekanik. Tes PATAg (Truchet, 1970; Tiery, 1967), untuk mempelajari adanya polisakarida dari sel tanaman. Sebagai pengkontras digunakan Uranil asetat yang dilakukan setelah fiksasi dengan OsO<sub>4</sub>. Preparat tadi direndam pada suhu rendah dalam larutan uranil asetat 1% dalam buffer veronal pH 7,2 selama 12 jam.

## HASIL

Hasil analisis histologi bintil akar tanaman clover dilakukan dengan menggunakan mikroskop optik dan mikroskop elektronik transmisi. Pengamatan struktur histologi dilakukan pada tanaman kontrol, yaitu tanaman yang selama hidupnya tidak mengalami cekaman; tanaman yang diperlakukan defoliiasi ringan, dan tanaman yang diperlakukan defoliiasi berat.

### 1. Bintil Akar Tanaman Kontrol (Tanpa Pemangkasan)

#### a. Kenampakan Umum

Pengecatan dengan metoda Hematoxyline (Lampiran 1, Gambar 1) dengan pembesaran 40x menunjukkan bahwa histologi bintil akar dapat dibedakan menjadi 4 zone yaitu zone meristema-

tik, zone perpanjangan sel, zone bakteroid penyemat N<sub>2</sub> dan zone penuaan (senescence). Jaringan korteks bintil akar terdiri 2 lapisan yang tidak nampak pada pembesaran ini. Jaringan pengangkutan terletak di bagian tepi bintil akar, antara jaringan korteks dan jaringan bagian tengah. Zone meristematik dan zone perpanjangan sel nampak jelas. Kandungan polisakarida lebih tinggi pada daerah perpanjangan sel. Pewarnaan lebih intensif diamati pada jaringan ini. Sel jaringan bintil akar pada zone bakteroid penyemat N<sub>2</sub> dan zone penuaan berisi sel-sel bakteroid di bagian tepi dengan vakuola terletak di bagian tengahnya. Vakuola pada zone bakteroid pada umumnya lebih kecil dari pada zone penuaan.

Dengan pengecatan PAS (Periodic Acide-Schiff Reagent) menunjukkan bahwa pada bagian ini (zone bakteroid dan zone senescence) mempunyai kandungan polisakarida lebih rendah dari pada bagian bintil akar yang lain.

#### b. Kenampakan Detail pada Zone Bakteroid Penyemat N<sub>2</sub>

Pengamatan dengan mikroskopi optik (Lampiran 1, Gambar 2) menunjukkan bahwa, sel bintil akar pada zone bakteroid penyemat N<sub>2</sub> berisi banyak sel-sel bakteroid yang berbatasan dengan vakuola. Inti sel berwarna lebih tua. Di bagian tengah dari sel-sel jaringan bintil akar berbentuk cincin tanpa bakteroid. Pada jaringan korteks bagian dalam, 2-3 lapisan selnya berukuran kecil dan tidak dijumpai adanya sel-sel bakteroid.

Dengan mikroskopi elektronik (Lampiran 1, Gambar 3 dan 4) dapat diketahui bahwa, dinding sel terlihat jelas. Disamping itu dapat dibedakan ruang antar sel, inti sel, butiran chromatine, dan mitokhondria. Mitokhondria ini umumnya berada pada tepian sel-sel yang terinfeksi rhizobium, yang umumnya berjumlah banyak pada tempat dekat dengan ruang antar sel. Dari hasil pengamatan, umumnya menunjukkan struktur aktif, terlihat adanya bentuk *cristae* yang jelas. Bakteroid dalam jumlah banyak pada sitoplasma sel yang masing-masing dibatasi dengan membran sekestrasi yang berasal dari plasmalema (Lampiran 1, Gambar 4) dan membran peribakteroid yang berasal dari bakteri sendiri. Nampak adanya vesikula dengan ukuran kecil dalam jumlah banyak (butiran poli  $\beta$  hidroksi butirat, Gourret *et al.*, 1974) yang berada pada tepian bakteroid.

Butiran pati umumnya merupakan bulatan memanjang yang terdapat pada tepian sel yang ter-

infeksi bakteri. Butiran ini pada umumnya terdapat dekat dengan ruang antar sel (Lampiran 1, Gambar 3 dan 4).

#### 2. Bintil Akar Tanaman yang Dipangkas Tajuknya

##### a. Dipangkas Ringan pada Tangkai Daunnya

###### Kenampakan Umum

Sel-sel pada jaringan bintil akar yang terletak pada zone bakteroid penyemat N<sub>2</sub> dan pada zone penuaan nampak tidak berbeda dibandingkan dengan tanaman kontrol. Akan tetapi, kandungan polisakarida pada jaringan ini nampak lebih rendah.

##### b. Tanaman Dipangkas Berat (Tangkai Daun dan Stolon)

###### 1). 24 Jam Setelah Dipangkas

###### a). Kenampakan Umum

Jaringan pengangkutan nampak tidak terjadi kerusakan akibat pemangkasan (Lampiran 2, Gambar 5). Zone meristematik dan zone perpanjangan sel hampir tidak terjadi perubahan akibat diadakan pemangkasan. Kandungan polisakarida seperti pada tanaman kontrol yang umumnya terakumulasi dan membentuk garis tegas dibelakang zone meristematik, tidak dijumpai pada bintil akar ini, atau kalau ada sangat rendah kadarnya. Bakteroid nampak lebih pucat, dan permukaan sel jaringan bintil akar yang terletak pada zone bakteroid penyemat N<sub>2</sub> tidak seluruhnya tertutup sel-sel bakteroid dibandingkan dengan kontrolnya.

###### b). Kenampakan Detail pada Zone Bateriaid Penyemat N<sub>2</sub>

Pengamatan mikroskopi optik (Lampiran 2, Gambar 6) dengan pembesaran kuat, terlihat bahwa jaringan korteks terdiri dari 2 lapis. Sel-sel korteks bagian dalam sama dengan tanaman kontrol, Pada sel-sel yang terinfeksi rhizobium terdapat vakuola sentral yang dikerumuni oleh sel-sel bakteroid.

Pengamatan mikroskopi elektronik menunjukkan bahwa, stroma dari sel bakteroid nampak kurang intensif terhadap elekton dibandingkan dengan tanaman kontrol. Butiran poli  $\beta$  hidroksi butirat nampak lebih sedikit (Lampiran

2, ambar 8). Berdasarkan pengamatan *cristae* yang ada, mitokhondria nampak kurang berfungsi dibandingkan dengan kontrolnya. Butiran amyllum terdapat dekat dengan ruang antar sel, yang nampak menggebu lebih besar (Lampiran 2, Gambar 7 dan 8) dari pada tanaman kontrol (Lampiran 1, Gambar 3 dan 4).

### 2). 5 Hari Setelah Dipangkas

Kandungan polisakarida mulai bertambah lagi dan nampak merupakan sabuk pada bagian apikal. Sel-sel pada jaringan bintil akar yang terletak pada zone penuaan sampai dengan zone bakteroid penyemat N2 nampak terjadi disorganisasi sel-sel bakteroidnya.

### 3). 7 Hari Setelah Dipangkas

#### a). Kenampakan Umum

Perbedaan struktur histologinya sangat nyata dibandingkan dengan kontrol. Zone penuaan terus berkembang dan terjadi disorganisasi sel-sel bakteroidnya lebih lanjut.

#### b). Kenampakan Detail

Bakteroid pada zone fiksasi terjadi degenerasi, dan kadang-kadang pada tepian sel bakteroid terjadi kerusakan (lysis).

### 4). 16 Hari Setelah Dipangkas

#### Kenampakan Umum

Morfologi bintil akar nampak lebih panjang. Bagian bintil akar serupa dengan tanaman kontrol. Zone bakteroid penyemat N2 dapat diidentifikasi dengan mudah dan batas zone bakteroid dengan zone senescence sangat tegas. Zone bakteroid penyemat N2 nampak sama dengan tanaman kontrol, yaitu terdapat vakuola sentral dengan ukuran kecil, dan dikelilingi oleh bakteroid dalam jumlah banyak.

## PEMBAHASAN

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa adanya perlakuan defoliiasi berat menyebabkan perubahan histologi bintil akar. Perubahan penting ultrastruktur jaringan bintil akar terjadi setelah adanya cekaman. Dalam waktu yang sama, diamati adanya penurunan laju penyematan N2 udara (Muljanto, 1994). Defoliiasi berat memang terjadinya proses penuaan (senescence) pada zone

bakteroid yang disebabkan terjadinya lysis pada membran sekestrasi yang menyebabkan kerusakan sebagian bakteroid oleh enzim lytase (lytiques) dari sel tumbuhan (Baird dan Webster, 1982, Pladys dan Rigaud, 1988). Aktivitas protease naik dengan adanya penuaan (senescence) (Vance *et al.*, 1980). Kijini *cit* Vance *et al.* (1980) mengatakan bahwa senescence pada jaringan bintil akar sebagai akibat terjadinya defisiensi unsur hara, regulasi hormon atau akumulasi senyawaan beracun.

Dengan demikian, terjadinya fluktuasi penyematan N2 udara pada tanaman yang berbintil akar dapat diterangkan sebagai berikut :

1. Kerusakan keseluruhan atau sebagian dari zone bakteroid penyemat N2 dari jaringan bintil akar merupakan perubahan penting dalam bakteroid yang terdapat dalam sel (Vance *et al.*, 1980), dan terjadinya percepatan penuaan jaringan bintil akar. Dalam waktu yang sama, kandungan polisakarida dalam zone bakteroid penyemat N2 terjadi perubahan cepat.

2. Adanya zone meristem dan zone perpanjangan sel mempunyai peranan penting dalam memperbaiki aktifitas fiksasi N2 udara. Tanaman clover putih mampu merestorasi sistem penyematan N2 lebih efisien, yaitu dengan jalan : a. Berfungsinya kembali bintil akar lama untuk menyemat N2 karena peranan jaringan meristem apikal yang mampu membentuk sel-sel baru yang dapat difiksasi oleh bakteri rhizobium; b. Populasi bintil akar baru yang lebih efisien dan mempunyai kekuatan lebih besar dalam penyematan N2 (Muljanto, 1994); c. Pertumbuhan sistem perakaran baru yang dapat menyediakan tempat untuk diinfeksi bakteri rhizobium (Muljanto, 1994). Adanya jaringan meristem tersebut menyebabkan tanaman tertentu mempunyai ketahanan bintil akar lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang mempunyai bintil akar sphérique seperti pada kedelai (Engin & Sprent, 1973). Dalam hal yang sama, struktur berkas pengangkutan tidak terjadi perubahan sehingga transpor dan pasokan senyawaan nitrogen tidak terganggu (Vance *et al.*, 1980).

3. Infeksi baru pada perakaran yang baru berbentuk oleh bakteri Rhizobium dalam tanah menyebabkan populasi baru bintil akar pada keseluruhan sistem perakaran (Butler, 1959, Muljanto, 1994), sehingga menyebabkan kenaikan efisiensi penyematan N2 udara.

Hasil observasi mikroskopis pada zone bakteroid penyemat N<sub>2</sub> yang mengalami cekaman, dapat diketahui bahwa adanya bakteri menunjukkan terjadinya kontaminasi *Rhizobium* saprofit atau *Rhizobium* muda yang belum menjadi bakteroid. Sprent (1976) menunjukkan bahwa *Rhizobium* bebas yang terdapat dalam tanah dijumpai dalam sel pada zone penuaan bintil akar yang mengalami cekaman, dimana bakteri tersebut menggunakan isi sel sebagai substrat nutrisinya. Vance *et al.* (1980) mengamati tanaman luzern dengan adanya kordon infeksi pada zone penuaan; bakteri pada kordon tersebut tidak terjadi lyse. Dalam hal ini, nampak terjadi penempatan bakteri dalam sel-sel bintil akar baru setelah defoliiasi. Penulis juga tidak menemukan kordon tersebut dalam zone yang mengalami penuaan sekalipun.

Pemotongan tangkai daun dan stolon menyebabkan penurunan kadar polisakarida (poli  $\beta$  hidroksi butirat dalam bakteroid) dalam zone bakteroid penyemat N<sub>2</sub> walaupun *amyloplast* nampak nyata, sangat voluminous pada pengamatan mikroskopi elektronik (Gambar 7 dan 8). Akan tetapi, pengamatan mikroskopi ini tidak dapat diperkirakan jumlahnya secara pasti. Kejadian tersebut di atas menunjukkan terjadinya penurunan kadar karbohidrat sangat cepat. Dari pengamatan Gordon *et al.* (1986) terjadi dalam waktu 2-3 jam setelah pemangkasan.

Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa cadangan karbohidrat yang dimobilisasikan ke bagian perakaran merupakan tanggapan bintil akar tanaman terhadap perlakuan defoliiasi berat. Terjadinya regenerasi bagian tajuk tanaman dan berfungsinya kembali daun tanaman dalam menjalankan fotosintesis, bintil akar akan mendapatkan sumber karbon dari : (1) daun sebagai hasil fotosintesis; (2) cadangan makanan dari stolon; (3) cadangan makanan dari bagian perakaran dan (4) cadangan makanan dari bintil akar sendiri.

## KESIMPULAN

Berdasarkan pengamatan ultrastruktur dan dinamika perkembangan bintil akar setelah mengalami pemangkasan, menunjukkan bahwa pemangkasan berat menyebabkan degradasi bakteroid penyemat N<sub>2</sub> dan modifikasi metabolisme karbohidrat dalam bintil akar. Tanaman clover putih mempunyai kemampuan untuk memperbaiki bagian yang melakukan fiksasi yang lebih efisien yang disebabkan terjadinya pertumbuhan

kembali bintil akar yang ada dan karena terjadinya infeksi baru *rhizobium*. Hal ini menyebabkan tanaman clover putih mempunyai adaptasi terhadap perlakuan defoliiasi berat cukup baik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Prof. Dr. A. Guckert dan Dr. C. Robin, advisor dan co-advisor program Doktor dalam bidang Ecofisiologi Tanaman di ENSAIA-INPL Perancis, karena bimbingan dan pemberian ijinnya untuk dapat menggunakan fasilitas di "Laboratoire de l'Ecophysiologie Vegetale, ENSAIA-INPL" Nancy, Perancis selama penelitian ini berlangsung; Prof. Dr. R. Rohr dan Dr. Supriyanto dalam persiapan pengamatan mikroskopi optik maupun mikroskopi elektronik pada "Laboratoire de Biologie, Universite de Nancy I" Nancy, Perancis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Baird, L.M. and B.D. Webster, 1982. Morphogenesis of effective and ineffective root nodules in *Phaseolus vulgaris* L., *Bot Gaz*, **143**, 41-51.
- Butler, G.W., R.M. Greenwood, and K. Soper, 1959. Effect of shading and defoliation and the turnover of root and nodule tissue of plants of *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* and *Lotus uliginosus*. *N.Z.J. Agric Res.*, **2**, 415-426.
- Engin, M.E. and J.I Sprent, 1973. Effect of water stress on growth and nitrogen fixing activity of *Trifolium repens*. *New Phytol.*, **72**, 117-126.
- Gordon, A.J., G.J.A. Ryle, D.F. Mitchell, K.H. Lowry and C.E. Powell, 1986. The effect of defoliation on carbohydrate, protein and leghaemoglobine content of white clover nodules. *Annals of Bot.*, **58**, 141-154.
- Gourret, J.P. and H. Fernandez-Arias, 1974. Une etude ultrastructurale et cytochimie de la differentiation des bacteroides de *Rhizobium trifolii* Dongeard dans les nodules de *Trifolium repens* L. *Can J. Microbiol.*, **20**, 1169-1181.
- Muljanto, D., 1994. Kemampuan merestorasi sistem perakaran dan aktivitas fiksasi N<sub>2</sub> pada tanaman clover putih (*Trifolium repens* L.) setelah

mengalami defoliiasi berat. *Agric. Sci.*, V(4): 713-722.

**Pladys, D. and J. Rigaud**, 1988. Lysis of bacteroids in vitro and during the senescence in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant physiol Biochem*, 26 (2), 179-186.

**Sprent, J.I.**, 1976. Nitrogen fixation by legumes subjected to water and light stress. In *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. P.S. Nutman ed., Cambridge Univ. Press., Cambridge : 405-420.

**Thiery, J.P.**, 1967. Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. *J. Microscopie*, 6, 987-1018.

**Truchet, G.**, 1970. Etude cytologie infrastructurales sur un cas de symbiose (*Pisum sativum et Rhizobium leguminosarum*): Relation entre la cellule-hote et la bacterie. *C.R. Acad.Sci.*, 270, 3047-3050.

**Vance, C.P., L.E.B. Johnson, A.M. Halvorsen, G.H. Heickel and D.K. Barnes**, 1980. Histological and ultrastrutural observation of *Medicago sativa* root nodule senescence after foliar removal. *Can J. Bot.*, 58, 295-309.

**Wood, M., J.E. Cooper, and A.J. Holding**, 1983. Method to assess the effects of soil acidity factors on legume-Rhizobium symbiosis. *Soil Biol Biochem*, 15 (1), 123-124.

## KETERANGAN GAMBAR PADA LAMPIRAN

- A : Butir amylum  
 B : Bakteroid  
 BD : Bakteroid yang mengalami degenerasi  
 CN : Jaringan kortek bintil akar  
 Mi : Mitochondria  
 Me : Ruang interseluler  
 MP : Membran peribakteroid  
 N : Inti sel  
 P : Dinding sel  
 PS : Dinding sel sekunder  
 V : Vacuola  
 ZA : Zone perpanjangan sel bintil akar  
 ZM : Zone meristematis bintil akar  
 ZB : Zone bakteroid penyemat N2 bintil akar  
 ZS : Zone penuaan sel (senescence) bintil akar

## Lampiran 1 :

Struktur Bintil Akar Tanaman kontrol (Tanpa pemangkasan) Tanaman ditumbuhkan pada media tanah dengan kandungan air tanah 80% kapasitas lapangan).

### 1. Mikroskopi Optik

Pewarnaan :

- Metoda hematoksilin (MH), eosin dan Blue al-cian pada irisan tipis (7,5  $\mu\text{m}$ ) yang dikerjakan setelah inklusi dalam parafin.
- Metoda PAS (Periodic Acide-Schiff Reagent) pada irisan tipis (7,5  $\mu\text{m}$ ) dikerjakan setelah inklusi dalam parafin.
- Metoda blue toluidine (BT) pada irisan semi halus (0,5  $\mu\text{m}$ ) yang dikerjakan setelah inklusi dalam resin.

### 2. Mikroskopi Elektronik Transmisi

Fiksasi dengan asam osmium dan larutan uranil asetat

Gambar 1 : Gambar umum irisan memanjang bintil akar tanaman kontrol, pembesaran 40X (HM).

Gambar 2 : Irisan memanjang bintil akar, pembesaran 560X (BT). Gambar detail jaringan korteks bintil akar dan sel bakteroid.

Gambar 3 : Gambar detail dua buah sel yang berdampingan pada zone bakteroid penyemat N2.

Gambar 4 : Butiran amylum dalam sel di zone bakteroid penyemat N2. (menggunkan metode Thiery)

## Lampiran 2 :

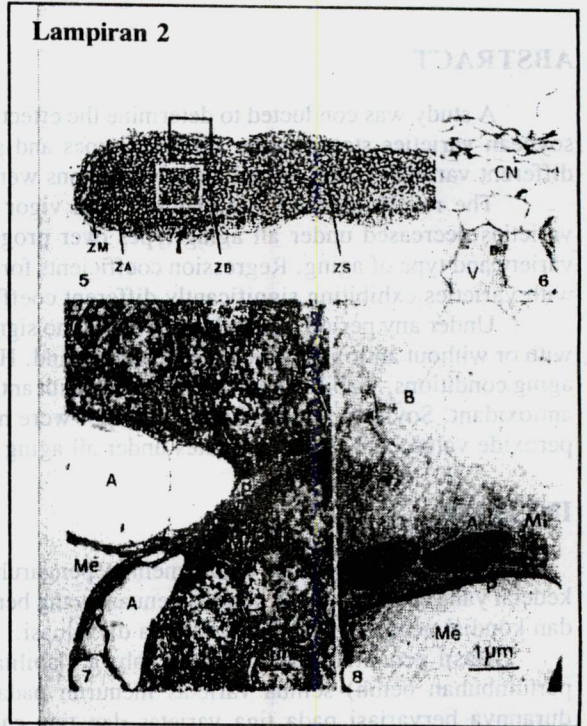
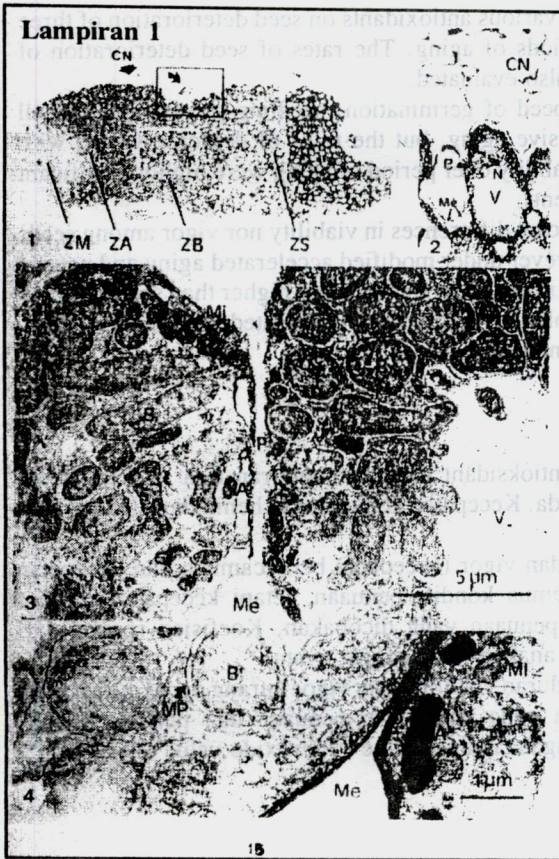
Pengaruh Defoliiasi Berat terhadap perubahan Histologi Bintil Akar, 24 jam setelah pemangkasan berat (tangkai daun dan stolonya).

Gambar 5 : Gambar umum irisan memanjang bintil akar, 24 jam setelah dipangkas bagian tangkai daun dan stolonya, pembesaran 40X (APS).

Gambar 6 : Gambar detail irisan memanjang bintil akar pada zone bakteroid penyemat N2 dan jaringan korteks, 24 jam setelah dipangkas tangkai daun dan stolonya, pembesaran 560X (BT).

Gambar 8 : Butiran amyllum dekat dengan ruang interselluler pada zone bakteroid penyemat N2, 24 jam setelah dipangkas tangkai daun dan stolonya (metode Thiery).

Gambar 7 : Gambar detail zone bakteroid penyemat N2, 24 jam setelah dipangkas tangkai daun dan stolonya.



... mechanical physical damage, and variation of genetic factors (Copoland, 1979). However, important factors which cause seed deterioration in storage include the relative humidity of the air, which controls seed moisture content, and temperature which affects the rate of biochemical processes in seeds (Korolovsk, 1972). It has been reported that deterioration of membranes and damage to phospholipid are the major reasons for

INTRODUCTION  
One of the most common problems in tropical and subtropical regions is the deterioration of stored seeds. The rate of seed deterioration is high during storage, especially in high humidity and high temperature. This is due to the fact that the rate of biochemical processes in seeds is high under these conditions. The rate of seed deterioration is high during storage, especially in high humidity and high temperature. This is due to the fact that the rate of biochemical processes in seeds is high under these conditions.

## INHIBITION OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merr.) SEED DETERIORATION USING ANTIOXIDANTS UNDER DIFFERENT ACCELERATED AND NATURAL AGING

Suyadi Mitrowihardjo<sup>1)</sup>

### ABSTRACT

A study was conducted to determine the effect of various antioxidants on seed deterioration of three soybean varieties stored under different types and periods of aging. The rates of seed deterioration of different varieties under varied aging conditions were also evaluated.

The results showed that viability, and vigor (speed of germination, seedling growth rate) of all varieties decreased under all aging types over progressive aging, but the rates of decrease varied with variety and type of aging. Regression coefficients for viability over period of aging were highly significant with varieties exhibiting significantly different coefficients.

Under any period of accelerated aging, no significant differences in viability nor vigor among seeds with or without antioxidant treatments were found. However under modified accelerated aging and natural aging conditions, viability and vigor of seeds with antioxidants were significantly higher than seeds without antioxidant. Soybean seed viability and vigor were highly and significantly correlated with iodine value, peroxide value, and solute leachates under all aging conditions.

### INTISARI

Penelitian dilakukan untuk melihat pengaruh antioksidan pada kemunduran tiga varietas benih kedelai yang disimpan pada kondisi penuaan yang berbeda. Kecepatan kemunduran benih dari tiga varietas dan kondisi penuaan yang berbeda juga dievaluasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa viabilitas dan vigor (kecepatan berkecambah dan kecepatan pertumbuhan benih) semua varietas menurun pada semua kondisi penuaan, tetapi kecepatan kemundurannya bervariasi pada tiga varietas dan tiga cara penuaan yang dicobakan. Koefisien regresi dari viabilitas terhadap periode penuaan menunjukkan hasil analisis yang sangat nyata.

Pengaruh antioxidant dalam menghambat kemunduran viabilitas dan vigor kurang dapat dilihat pada penuaan yang dipacu/dipercepat, tetapi nyata terlihat pada modifikasi penuaan dan penuaan alami. Viabilitas dan vigor benih sangat nyata berkorelasi dengan 'iodine value', 'peroxide value', dan 'solute leachates' pada semua kondisi penuaan.

*Key words* : antioxidant, soybean, accelerated aging

### INTRODUCTION

One of the major constraints in tropical soybean production is the fast rate of seed deterioration in storage resulting in a lack of adequate supply of high quality seeds for planting. Rapid loss of viability and vigor during storage resulting in poor stand, poor establishment, poor growth and low production. The rate of seed deterioration is affected by microorganisms (pathological fac-

tors), mechanical (physical damage), and varietal or genetic factors (Copeland, 1976). However, important factors which cause seed deterioration in storage include the relative humidity of the air which controls seed moisture content, and temperature which affects the rates of biochemical processes in seeds (Kozlowski, 1972). It has been reported that deterioration of membranes and damage to phospholipid are the major reasons in

<sup>1)</sup> Dept. of Agronomy, Fac. of Agriculture, Gadjah Mada University