

TANGGAPAN FISIOLOGIS SOMAKLONAL ANDALAS (*Morus macroura* Miq. var. *macroura*) PADA PENINGKATAN KANDUNGAN POLIETILENA GLIKOL DALAM MEDIUM SELEKSI CEKAMAN KEKERINGAN *IN VITRO*

M. Idris^{1*} dan Mansyurdin²

¹Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi

²Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, Padang

*email : uwakidris@gmail.com / midris@fmipa.unand.ac.id

ABSTRAK

Penelitian tentang tanggapan fisiologis somaklonal Andalas pada peningkatan kandungan polietilena glikol (PEG) dalam medium seleksi cekaman kekeringan telah dilakukan dengan metode eksperimen memanfaatkan teknik *in vitro* melalui pengamatan secara deskriptif. Penelitian terdiri atas dua tahapan seleksi yaitu tahap awal menggunakan PEG pada rentang konsentrasi 1,25% maksimal 5% yang kemudian diperbanyak dengan dan tanpa penambahan PEG maksimal dimana eksplan bertahan hidup. Tahap lanjutan menggunakan PEG pada konsentrasi kelipatan 0,25% diatas konsentrasi maksimal yang mampu ditolerir pada tahap sebelumnya yang dilanjutkan dengan perbanyak dan induksi perakaran tunas pada medium dengan dan tanpa PEG. Hasil penelitian memberikan gambaran bahwa penambahan 3,75% PEG pada tahap pertama merupakan konsentrasi maksimum yang mampu ditolerir oleh eksplan dan 4% pada tahap selanjutnya. Cekaman kekeringan yang dialami eksplan klon Andalas menyebabkan pengurangan luas daun dan jumlah stomata namun sebaliknya terjadi peningkatan kadar proline dan ketebalan daun.

Kata Kunci : Andalas, daun, kekeringan, proline, PEG, somaklonal.

Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional Biologi Departemen Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara, Medan, Sumatera Utara 22 Januari 2011.

Prosiding Seminar Nasional Biologi Departemen Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara (editor : Salomo Hutahean, Syafrudin Ilyas, Suci Rahayu dan Kaniwa Berliani). USU press. Medan. P :717-728)

1. PENDAHULUAN

Tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq. var. *macroura*) merupakan salah satu tumbuhan asli Sumatera Barat. Tumbuhan ini tergolong kedalam salah satu tumbuhan langka endemik Indonesia terutama Sumatera. Tumbuhan Andalas memiliki kualitas kayu yang sangat baik

untuk bahan perabotan (Dahlan, 1994). Tumbuhan ini mengandung senyawa kimia berpotensi sebagai obat leukemia, anti tumor dan anti bakteri (Achmad *et al*, 2001).

Berdasarkan kualitas kayunya yang tergolong sangat baik, Andalas sangat potensial dikembangkan untuk tanaman hutan industri. Namun, hal ini terkendala akibat habitatnya yang terbatas di daerah dengan kelembaban yang relatif tinggi. Padahal, areal-areal yang tersedia umumnya adalah lahan terbuka atau bekas tebangan yang sering sudah kering, tandus dan kritis. Oleh karena itu perlu upaya mendapatkan klon-klon baru tumbuhan Andalas yang toleran kekeringan.

Salah satu alternatif untuk penyediaan klon yang toleran terhadap kekeringan adalah melalui seleksi somaklonal Andalas dengan menggunakan polietilena glikol (PEG) secara *in vitro*. Metode ini telah dilakukan pada kopi (Tirtoboma, 1997), dan jenis tumbuhan berkayu yaitu *Eucalyptus grandis*, *Picea mariana*, *Pinus banksiana* (Fan dan Blake, 1997), *Mulberry-Morus* sp. (Tewary *et al*, 2000) pada kisaran 2-10% PEG. Pada tumbuhan yang mengalami cekaman kekeringan, biasanya dihasilkan senyawa asam amino terutama prolina (Bates *et al.*, 1973; Ünyayar, Keles dan Ünal, 2004). Biosintesis prolina yang berlebihan terpacu akibat rendahnya potensial air pada jaringan tumbuhan (Coluzzi dan Rast, 2000). Selain itu, juga terjadi penurunan ukuran daun (Rhizopoulou dan Psaras, 2003) serta terjadinya perubahan pada ketebalan daun dan pengurangan jumlah stomata (Sobrado, 2007).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui batas konsentrasi PEG maksimal yang mampu ditolerir oleh tumbuhan Andalas setelah dilakukan seleksi secara bertahap. Tanggapan fisiologis somaklonal yang memperlihatkan toleransi cekaman kekeringan diamati dalam bentuk kandungan prolina, luas daun serta ketebalan daun dan stomata pada permukaan bawah daun. Beberapa faktor tersebut berkemungkinan besar mengalami perubahan akibat cekaman kekeringan yang dialami.

2. CARA KERJA

2.1. Bahan klon tumbuhan Andalas sebagai sumber eksplan

Bahan klon tumbuhan Andalas yang dimanfaatkan sebagai eksplan berupa pucuk yang berasal dari perbanyakan *in vitro* tumbuhan Andalas dengan sumber eksplan berasal dari Nagari Andaleh Kab. Tanah Datar, Sumatera Barat pada medium MS dengan penambahan 3 mg/l BA dan 10 mg/l biotin.

2.2. Media Kultur

Medium dasar Murashige-Skoog (MS) komposisi penuh digunakan sebagai media dasar dengan penambahan 3 mg/l BA, 10 mg/l biotin, 0,7% agar, 3% sukrosa untuk medium multiplikasi pucuk (SM) dan MS setengah komposisi dengan penambahan 10 mg/l biotin, 0,7% agar, 3% sukrosa untuk medium induksi perakaran (RI) (Suwirman, 2007). Pada masing-masing medium ditambahkan PEG sebagai pengatur cekaman kekeringan sesuai dengan perlakuan pada setiap tahap penelitian. Keasaman media kultur diatur hingga mencapai pH $5,5 \pm 0,5$. Media kultur dimasak sampai mendidih dan kemudian dituang ke dalam botol-botol kultur steril dan disterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs.

2.3. Tahapan penelitian

2.3.1. Cekaman kekeringan *in vitro* tahap I (awal)

Pada tahap ini, eksplan berupa pucuk diperlakukan dalam media inisiasi pucuk-SI (MS komposisi penuh + 10 mg/l biotin) (Suwirnen, 2007) dengan penambahan PEG sebagai faktor pengatur cekaman kekeringan dalam 5 taraf konsentrasi yaitu PEG 0 ; 1.25; 2.50; 3.75; dan 5.00%. Eksplan hasil tahap inisiasi disubkultur pada medium multiplikasi pucuk yang terdiri dari medium tanpa penambahan PEG dan medium dengan penambahan konsentrasi PEG maksimal dimana eksplan masih mampu bertahan hidup.

2.3.2. Cekaman kekeringan *in vitro* tahap II (lanjutan)

Pada tahap ini, pucuk yang diperoleh dari perlakuan konsentrasi PEG maksimal yang bertahan hidup disubkultur pada medium yang ditingkatkan konsentrasi PEG nya dengan kelipatan 0,25% sampai dibawah batas eksplan mengalami kematian dengan perlakuan PEG. Kemudian dilakukan perbanyakan tunas pada medium dengan dan tanpa PEG sesuai dengan perlakuan sebelumnya serta penginduksian perakaran pada medium RI dengan dan tanpa PEG sesuai dengan hasil seleksi.

Pada setiap tahapan penelitian, eksplan diperlakukan dalam medium perlakuan masing-masing selama 30 hari. Eksplan dipelihara pada ruang inkubasi untuk pertumbuhan eksplan. Ruang inkubasi diatur suhunya pada kisaran $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan fotoperiodisme 12L / 12D dan intensitas cahaya 500-1500 Lux untuk multiplikasi tunas dan 1500-3000 Lux untuk induksi perakaran.

2.4. Parameter Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada akhir penelitian yaitu pada akhir tahap induksi perakaran. Data dianalisis secara deskriptif karena keterbatasan planlet yang berhasil bertahan setelah tahapan induksi perakaran. Beberapa parameter yang diamati pada penelitian adalah sebagai berikut:

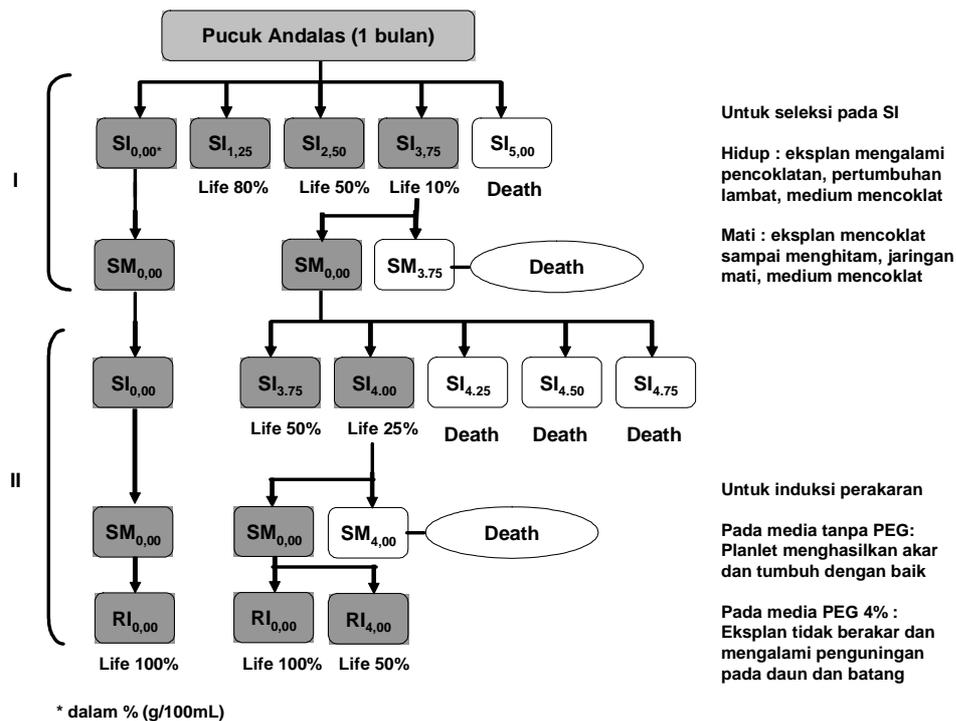
1. Keberhasilan seleksi cekaman kekeringan dengan menggunakan PEG
Kemampuan bertahan somaklonal andalas terhadap tahapan pemberian PEG diamati setiap tahapan sampai dihasilkan somaklonal yang andalas yang toleran kekeringan sewaktu dilakukan induksi perakaran.
2. Kandungan prolina
Kandungan prolina bebas dihitung dengan menggunakan metode spektrofotometer berdasarkan reaksi kolorimetrik dengan ninhidrin yang mengacu pada metode yang dikembangkan Bates *et al.*, (1973) dan Singh *et al.*, (1973) dimodifikasi oleh Peguin dan Lechasseur (1979).
3. Luas daun
pengukuran terhadap luas permukaan daun dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri menurut Sitompul dan Guritno (1995).
4. Ketebalan daun dan jumlah stomata
Pengukuran ketebalan daun dan jumlah stomata dilakukan dengan menggunakan sayatan preparat semi permanen daun yang diamati menggunakan mikroskop Olympus Microscope Model CX21FS1 dan dilakukan pemotretan menggunakan kamera digital merk Nikon Coolpix S700.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil Seleksi Eksplan pada Cekaman Menggunakan PEG secara *In Vitro*

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan didapatkan bahwa pada tahap awal hanya 10% dari total eksplan Andalas yang mampu bertahan hidup pada konsentrasi PEG 3,75%. Pada tahap seleksi lanjutan, eksplan Andalas mampu mentolerir peningkatan konsentrasi PEG maksimal pada taraf 4% dimana hanya 25% dari total eksplan yang diperlakukan mampu bertahan hidup. Pada media perakaran, eksplan hasil seleksi yang ditanam pada media dengan penambahan PEG tidak memperlihatkan adanya pembentukan akar (Gambar 1).

Tewary *et al.*, (2000) mendapatkan ketahanan tanaman mulberry terhadap cekaman kekeringan maksimal pada konsentrasi PEG 4%. Tunas yang dihasilkan mengalami pertumbuhan yang lebih lambat dengan semakin meningkatnya kandungan PEG pada medium. Konsentrasi PEG diatas 4% memperlihatkan kematian pada eksplan yang diperlakukan sampai konsentrasi PEG 10%. Ahmad *et al.*, (2007) mendapatkan pembentukan dan pertumbuhan akar semakin menurun akibat semakin tingginya cekaman garam yang diperoleh sebelumnya oleh eksplan sewaktu diinisiasi dengan kondisi cekaman garam di tahap sebelumnya.



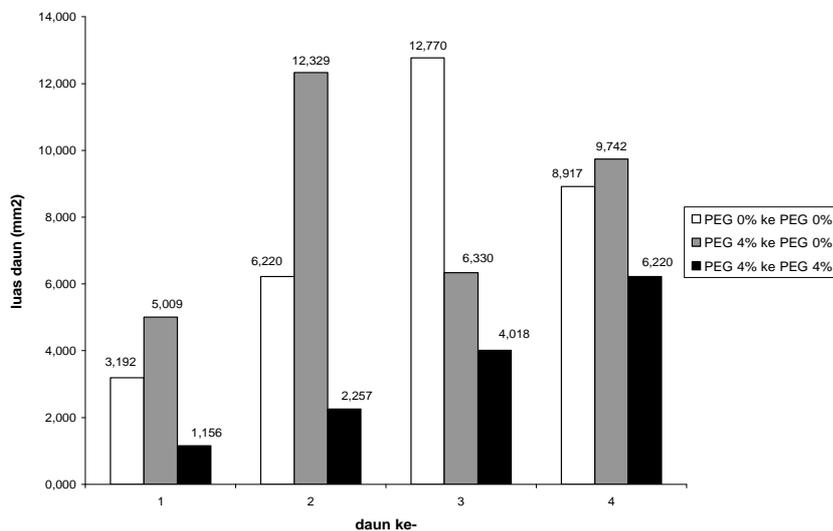
Gambar 1. Tahapan seleksi somaklonal Andalas yang memperlihatkan persentase eksplan yang mampu bertahan hidup serta respon yang diberikan oleh eksplan akibat cekaman kekeringan PEG yang dialami.

3.2. Karakter fisiologi planlet klon Andalas hasil seleksi kekeringan PEG

3.2.1. Luas daun planlet klon Andalas

Luas daun planlet klon Andalas hasil seleksi kekeringan memperlihatkan ukuran yang jauh lebih besar dibandingkan kontrol setelah dipindahkan dari medium perlakuan PEG 4% ke medium tanpa PEG (Gambar 2.). Sedangkan luas daun planlet yang berasal dari PEG 4% dan ditumbuhkan pada medium perakaran dengan penambahan PEG 4% memperlihatkan luas daun yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Pada perlakuan induksi perakaran dengan penambahan PEG 4%, daun pertama sampai keempat memperlihatkan luas daun yang tidak mengalami pertumbuhan baik pada daun pertama dan kedua maupun ketiga yang mengindikasikan tidak terjadinya aktivitas pertumbuhan karena daun tersebut tidak memiliki luas daun yang melebihi daun keempat.

Pada perlakuan eksplan yang berasal dari PEG 4% yang dipindahkan pada medium induksi perakaran tanpa pemberian PEG memperlihatkan pertumbuhan yang pesat pada daun kedua yang lebih luas dibandingkan daun ketiga atau keempat sedangkan pada kontrol daun ketiga lebih pesat pertumbuhannya dibandingkan daun yang lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa pada eksplan yang berasal dari perlakuan PEG akan menyesuaikan lagi dengan kondisi lingkungan sehingga pertumbuhan daun agak lambat. Setelah mampu beradaptasi dengan kondisi medium yang tidak mengalami cekaman, pertumbuhan lebih terpacu yang terlihat dari pesatnya pertumbuhan daun kedua. Pada kontrol, pertumbuhan daun ketiga yang cepat dikarenakan tidak adanya masa penyesuaian dengan lingkungan medium karena medium awal dan medium baru memiliki kondisi yang sama sehingga daun ketiga pertumbuhannya lebih baik sedangkan daun pertama dan kedua belum mencapai pertumbuhan optimalnya.



Gambar 2. Perbandingan rata-rata luas daun ke-1, 2, 3 dan 4 planlet klon Andalas pada media perakaran tanpa penambahan PEG dan penambahan PEG 4% sebagai pengatur cekaman kekeringan secara *in vitro* pada tahap akhir perlakuan

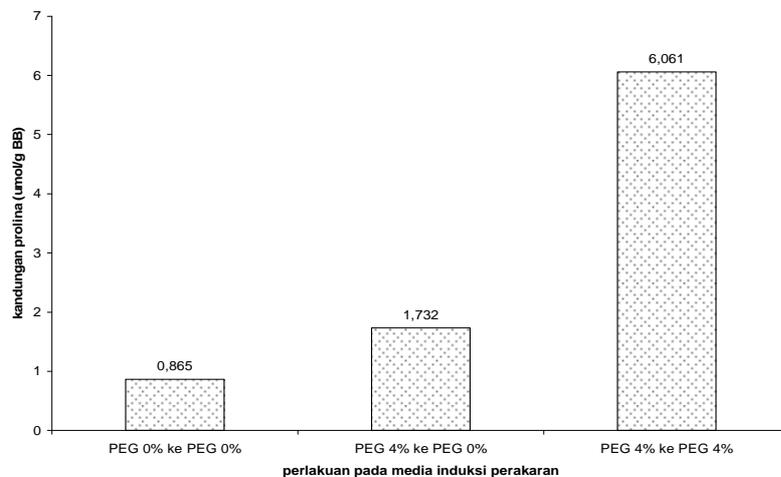
Pemberian PEG pada medium pertumbuhan menurunkan pertumbuhan daun sehingga mengurangi luas permukaan daun. Rendahnya aktivitas pertumbuhan daun dikarenakan adanya upaya untuk mengurangi tingginya penguapan air oleh permukaan daun. Daun pada tumbuhan yang mengalami cekaman kekeringan dengan menggunakan PEG memiliki ukuran yang

relatif kecil dan biasanya tingkat ketebalan daun lebih besar dibandingkan daun yang tidak mengalami cekaman kekeringan. Selain itu, pengurangan pasokan nutrisi dan sukrosa dari medium untuk memacu pertumbuhan juga menyebabkan pertumbuhan daun akan terganggu sehingga luas daun akan berkurang jika dibandingkan dengan luas daun tanpa pemberian PEG (Veeranjaneyulu dan Kumari, 1989).

Pada tumbuhan jarak (*Ricinus communis*) yang mengalami cekaman kekeringan, area pertumbuhan daun akan semakin menurun dengan semakin lamanya cekaman yang dialaminya (Heckenberg *et al.*, 1998; Schurr *et al.*, 2000). Selama cekaman kekeringan, juga terjadi pengurangan area perluasan daun yang berakibat ukuran daun akan semakin kecil jika dibandingkan dengan kondisi tanpa mengalami kekeringan (Granier dan Tardieu, 1999). Duran *et al.* (1995) sebelumnya mendapatkan pemanjangan daun yang terhambat akibat cekaman kekeringan yang dialami oleh tumbuhan tall fescue. Alves dan Setter (2004) mendapatkan hasil tumbuhan yang sebelumnya mengalami cekaman kekeringan jika dipindahkan pada kondisi normal akan memiliki pertumbuhan daun yang lebih baik dan terpacu bila dibandingkan dengan kondisi tumbuhan sewaktu mengalami cekaman kekeringan. Selain itu, cekaman kekeringan yang dialami oleh tumbuhan akan mengurangi jumlah sel yang menyusun organ daun tersebut akibat terhentinya aktifitas pertumbuhan dan perkembangan daun.

3.2.2. Kandungan prolina planlet klon Andalas

Planlet yang diperlakukan dengan pemberian konsentrasi PEG pada taraf 4% memiliki kandungan prolina yang jauh lebih tinggi dari perlakuan lainnya (Gambar 3.). Pada daun planlet yang berasal dari perbanyakan pada pemberian PEG 4% dan diakarkan pada medium dengan penambahan PEG 4% memiliki kandungan prolina 6,061 $\mu\text{mol/g}$ BB sedangkan pada planlet yang berasal dari perlakuan PEG 4% dan diakarkan pada media tanpa PEG kandungan prolina 1,732 $\mu\text{mol/g}$ BB dan pada kontrol 0,865 $\mu\text{mol/g}$ BB. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin tinggi cekaman yang terjadi pada planlet oleh kondisi lingkungan yang ekstrim maka semakin tinggi kandungan prolina. Selain itu, pemindahan eksplan dari kondisi cekaman ke kondisi tanpa cekaman akan mengurangi kandungan prolina pada planlet. Hal ini terlihat dari rendahnya kandungan prolina planlet yang dipindahkan dari cekaman PEG 4% ke medium induksi perakaran tanpa menggunakan PEG.



Gambar 3. Perbandingan rata-rata kandungan prolina ($\mu\text{mol/g}$ BB) pada tiga perlakuan pemberian konsentrasi PEG pada tahap perakaran planlet klon Andalas yang toleran terhadap kondisi kekeringan setelah 30 hari pada medium perlakuan

Agastian *et al.*, (2000) mendapatkan peningkatan kandungan prolina seiring dengan peningkatan konsentrasi garam pada mulberry. Harinasut *et al.*, (2000) mendapatkan kandungan prolina pada daun Mulberry meningkat 11 kali pada kondisi cekaman garam NaCl sebesar 150 mM bila dibandingkan dengan kontrol. Ahmad *et al.* (2007) melakukan seleksi kultivar *Morus alba* terhadap cekaman garam dimana terjadi peningkatan kandungan prolina sebesar 89,2% (kultivar lokal) dan 85,5% (kultivar Sujanpuri) pada pengujian secara *in vitro*. Akumulasi prolina yang terjadi pada sel tumbuhan merupakan mekanisme adaptasi dalam mempertahankan tekanan turgor sel, penyerapan air dan kelangsungan berbagai proses fisiologis dalam sel seperti pembukaan stomata dan perkembangan sel (Serajj dan Sinclair, 2002; Ismail *et al.*, 2004; Gomez dan Prado, 2007).

3.2.3. Ketebalan daun dan jumlah stomata

Rata-rata jumlah stomata semakin menurun dengan semakin tingginya cekaman kekeringan yang dialami oleh planlet klon Andalas. Berdasarkan data terlihat bahwa terjadi penurunan jumlah stomata yang mencolok dari kondisi tanpa pemberian PEG dengan pemberian PEG 4%. Stomata pada eksplan yang ditumbuhkan dalam medium tanpa penambahan PEG memperlihatkan ukuran yang relatif sama bila dibandingkan dengan eksplan yang ditumbuhkan pada medium dengan PEG 4% . Sebaliknya, terlihat bahwa terjadi peningkatan ketebalan daun yang mencolok pada perlakuan dari PEG 4% yang diakarkan pada PEG 4%, sedangkan pada perlakuan PEG 4% yang diakarkan pada PEG 0% terlihat ketebalan daun lebih kecil dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Tabel 1.). Hal ini diduga karena sedikitnya air yang bisa diserap oleh tumbuhan sehingga jaringan tumbuhan melakukan penghematan air dengan menambah ketebalan daun dan mengurangi jumlah stomata pada permukaan daun sehingga air dapat dipertahankan dalam tumbuhan.

Tabel 1. Kisaran ketebalan daun dan rata-rata jumlah stomata planlet klon Andalas pada medium perakaran dengan dan tanpa pemakaian PEG 4% sebagai pengatur cekaman kekeringan setelah 30 hari pada media perlakuan.

No	Perlakuan Induksi Perakaran	Kisaran Ketebalan daun (μm)	Rata-rata jumlah stomata ($/\text{mm}^2$)
1	disubkultur pada PEG 0%	76,66 – 99,99	800
2	disubkultur pada PEG 4%	73,33 – 83,33	425
3	disubkultur pada PEG 0%	139,99 – 159,98	275

Inamullah dan Isoda (2005) menyatakan bahwa tumbuhan yang diperlakukan dengan kondisi cekaman lingkungan yang lebih tinggi akan mengakibatkan berkurangnya area stomata, kerusakan dan kematian pada sel-sel penyusun stomata. Kondisi perlakuan cekaman lingkungan seperti kekeringan dan garam memberikan pengaruh terhadap struktur anatomi daun terutama terjadi modifikasi pada stomata dan sel-sel epidermis dimana lapisan epikutikular menjadi lebih tebal yang menyebabkan daun menjadi lebih tebal (Shepperd dan Griffiths, 2006).

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian memberikan gambaran bahwa eksplan klon Andalas mampu bertahan hidup pada tingkat cekaman kekeringan menggunakan PEG pada kisaran konsentrasi 3,75-4%. Cekaman kekeringan yang dialami eksplan klon Andalas menyebabkan pengurangan luas daun dan jumlah stomata namun sebaliknya terjadi peningkatan kadar prolina dan ketebalan daun.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dra. Sjahridal Dahlan, MS. yang telah memberikan sumbangan pemikiran dan masukan dalam penelitian ini serta atas izin yang diberikan dalam memakai fasilitas yang tersedia pada Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas. Penulis juga mengucapkan terimakasih pada Tim *Morus macroura* (Andalas) Laboratorium Fisiologi Tumbuhan atas kerjasamanya.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S. A., N. Aimi, E. L. Ghisalberty, E. H. Hakim, Jasmansyah, L. D. Juliawaty, L. Makmur, Y. Manjang, U. Supratman, Suyanto, R. Tamin, dan A. Yelminda. 2001. Some New Compunds from Indonesian Moraceae. *Proceedings, International Seminar on Tropical Rainforest Plants*. Padang. 25 hal.
- Agastian, P., S. J. Kingsley, and M. Vivekanandan. 2000. Effect of Salinity on Photosynthesis and Biochemical Characteristic in Mulberry Genotypes. *Photosynthetica* 38 : 287-290.
- Ahmad, P., S. Sharma, and P. S. Srivastava. 2007. *In Vitro* Selection of NaHCO₃ Tolerant Cultivars of *Morus alba* (Local and Sujanpuri) in Response to Morphological and Biochemical Parameters. *Hort. Sci. (Progue)* 34 (3) : 114-122.
- Alves, A. A. C., and T. L. Setter. 2004. Response of Cassava Leaf Area Expansion to Water Deficit : Cell Proliferation, Cell Expansion and Delayed Development. *Annals of Bot.* 94 : 605-613.
- Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies. *Plant and Soil* 39 (1) : 205-207.
- Coluzzii, G., and R. Last. 2000. Chapter 8. Amino Acids (Part 2. Cell Reproduction). In: Buchanan, B. B., W. Gruissem and R. L. Jones (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville-Maryland. 358-410.
- Dahlan, S. 1994. Mengenal *Morus macroura* Miq. Maskot Flora Sumatera Barat. *Jurnal Penelitian Andalas* 15 : 17-20.
- Duran, J. L., B. Onillon, H. Schnyder, and I. Rademarcher. 1995. Drought Effects on Cellular and Spatial Parameter of Leaf Growth in Tail Fescue. *J. of Exp. Bot.* 46 (290) : 1147-1155.
- Fan, S., and T. J. Blake. 1997. Comparison of Polyethylene Glycol 3350 Induced Osmotic Stress and Soil Drying for Drought Simulation in Three Woody Species. *Tree-Structure and Function* 11 (6) : 342-348.

- Gomez, F. P., and C. H. B. A. Prado. 2007. Ecophysiology of Coconut Palm Under water Stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 19 (4) : 377-391.
- Granier, C., and F. Tardieu. 1999. Water Deficit and Spatial Pattern of Leaf Development. Variability in Responses can be Simulated Using a Simple Model of Leaf Development. *Plant Physiol.* 119 : 609-619.
- Harinasut, P., S. Srisunak, S. Pitukchaisopol and R. Charoensataporn. 2000. Mechanism of Adaptation to Increasing Salinity of Mulberry : Proline Content and Ascorbate Peroxidase Activity in Leaves of Multiple Shoots. *Science Asia* 26 : 207-211.
- Heckenberg, U., U. Roggatz, and U. Scurr. 1998. Effect of Drought Stress on The Cytological Status in *Ricinus communis*. *J. of Exp. Bot.* 49 (319) : 181-189.
- Inamullah, and A. Isoda. 2005. Adaptive Responses of Soybeans and Cotton to Water Stress I. Transpiration Changes in Relation to Stomata Area and Stomata Conductance. *Plant Prod. Sci.* 8 (1) : 16-26.
- Ismail. M. R., M. K. Yusoff, and M. Mahmood. 2004. Growth, Water Relations, Stomatal Conductance and Proline Concentration in Water Stressed Banana (*Musa* spp.) Plants. *Asian Journal of Plant Sciences* 3 (6) : 709-713.
- Paquin, R., and P. Lechasseur. 1979. Observations sur Une Methode de Dosage de la Proline Libre dans Les Extraits de Plantes. *Can. J. Bot.* 57 : 1815-1854.
- Rhizopoulou, S., and G. K. Psaras. 2003. Development and Structure of Drought Tolerant Leaves of The Mediterranean Shrub *Capparis spinosa* L. *Annals of Botany* 92 : 377-383.
- Schurr, U., U. Heckenberg, K. Herdel, A. Walter and R. Feli. 2000. Leaf Development in *Ricinus communis* During Drought Stress : Dynamics of Growth Processes of Cellular Structure and of Sink-Source Transition. *J. of Exp. Bot.* 51 (350) : 1515-1529.
- Serraj, R., and T. R. Sinclair. 2002. Osmolyte Accumulation : Can It Really Help Increase Crop Yield under Drought Condition?. *Plant Cell Environ.* 25 : 333-350.
- Shepherd, T., and D. W. Griffiths. 2006. The Effects of Stress on Plant Cuticular Waxes (*Tansley Review*). *New Phytol.* 171 : 469-499.
- Singh, T. N., L. G. Paleg, and D. Aspinall. 1973. Stress Metabolism. I. Nitrogen Metabolism and Growth in The Barley Plant. *Aust. J. Biol. Sci.* 26 : 45-56.
- Sitompul, S. M. dan B. Guritno. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sobrado, M. A. 2007. Relationship of Water Transport to Anatomical Features in The Mangrove *Laguncularia racemosa* Grown Under Contrasting Salinities. *New Phytologist* 173 : 584-591.
- Suwirmen. 2007. Produksi Bibit Pohon Andalas (*Morus macroura* Miq.) secara *In Vitro* dalam Upaya Pelestarian Maskot Flora Sumatera Barat. Laporan Research Grand Technological and Profesional Skill Development Sector Project (TPSDP) Batch III/2006 Universitas Andalas. Padang.
- Tewary, P. K., A. Sharma, M. K. Raghunath and A. Sarkar. 2000. *In Vitro* Response of Promosing Mulberry (*Morus* sp.) Genotypes for Tolerance to Salt and Osmotic Stresses. *Plant Growth Regulation* 30 (1) : 17-21.
- Tirtoboma. 1997. In vitro Selection and Acclimatization of Robusta Coffee Tolerant to Water Stress. *Menara Perkebunan (Indonesian Journal of Biotechnology Research on Estate Crops)* 65 (1) : 9-16.
- Ünyayar, S., Y. Keles and E. Ünal. 2004. Proline and ABA Levels in Two Sunflower Genotypes Subjected to Water Stress. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30 (3-4) : 34-47.
- Veeranjaneyulu, K., and B. D. R. Kumari. 1989. Proline Metabolism During Water Stress in Mulberry (*Research Articiel*). *J. Exp. Bot.* 40 (5) : 581-583.