



TESIS - SB142502

**RESPON FISIOGENETIK TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum L.*) TERHADAP CEKAMAN GENANGAN PERIODIK**

DESY DWI NURCAHYANI

NRP.1515 201 202

DOSEN PEMBIMBING

Dr. Dewi Hidayati, M.Si.

Dr. Nurul Jadid, M.Sc.

PROGRAM MAGISTER

DEPARTEMEN BIOLOGI

FAKULTAS ILMU ALAM

INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER

SURABAYA

2018

## LEMBAR PENGESAHAN

Respon Fisiogenetik Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap Cekaman  
Genangan Periodik

Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar  
Magister Sains (M.Si)  
di  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh  
Desy Dwi Nurcahyani  
NRP : 1515201202

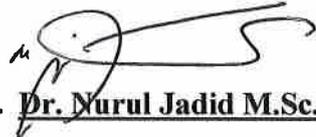
Tanggal Ujian : 29 Januari 2018  
Periode Wisuda : Maret 2018

Disetujui oleh :



1. **Dr. Dewi Hidayati M.Si.** (Pembimbing I)

NIP: 19691121 199802 2 001



2. **Dr. Nurul Jadid M.Sc.** (Pembimbing II)

NIP : 19820512 200501 1 002



3. **Mukhamad Muryono M.Si Ph.D** (Penguji I)

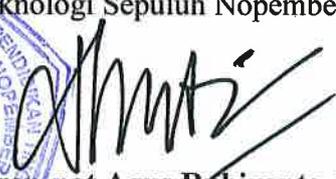
NIP: 19790629 200812 1 001



4. **Dr. Techn. Endry Nugroho P. M.T.** (Penguji II)

NIP: 19731014 200012 1 001

Fakultas Ilmu Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Dekan



**Prof. Dr. rer. nat Agus Rubiyanto, M. Eng. Sc.**  
NIP: 19650619 198903 1 001



# **RESPON FISIOGENETIK TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum L*) TERHADAP CEKAMAN GENANGAN PERIODIK**

Mahasiswa Nama : Desy Dwi Nurcahyani  
Mahasiswa ID : 1515 201 202  
Pembimbing : Dr. Dewi Hidayati M.Si  
Co-Supervisor : Dr. Nurul Jadid, M.Sc.

## **ABSTRAK**

Tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) merupakan jenis tanaman yang sangat di kenal di indonesia karena perannya yang cukup besar dalam bidang perekonomian. Cekaman genangan periodik merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman tembakau. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon tumbuhan dari 2 aspek yaitu fisiologis dan genetiknya terhadap cekaman genangan periodik. Aspek fisiologis yang diamati berupa laju fotosintesis, kandungan klorofil serta kadar Aktifitas Nitrat Reductase (ANR). Sedangkan aspek genetik yang diamati ialah ekspresi gen responsif cekaman genangan antara lain *NtADHI* dan *NtACSI*. Perlakuan yang diberikan ialah cekaman genangan secara periodik yaitu dimulai dari perlakuan *waterlogging* dilanjutkan dengan perlakuan *flooding*. Hasil penelitian menunjukkan, Pada kondisi cekaman *waterlogging* varietas jepun emas memiliki respon terbaik terhadap parameter laju fotosintesis sebesar  $103 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ANR sebesar  $1,77 \mu\text{mol/jam}$ , kenaikan level ekspresi *NtADHI* dan *NtACSI*. Pada kondisi cekaman *flooding*, varietas jinten memiliki respon terbaik terhadap parameter laju fotosintesis  $113,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , kandungan klorofil sebesar  $0,54 \text{ mg/l}$ , ANR sebesar  $2,79 \mu\text{mol/jam}$  dan Level Ekspresi *NtADHI*. Varietas Manilo menjadi varietas yang paling sensitif pada perlakuan *waterlogging*, dan varietas P951 menjadi varietas yang paling sensitif pada perlakuan *flooding*.

**Kata kunci:** *Nicotiana tabacum*, Ekspresi gen, *Waterlogging*, *Flooding*, Fisiologis, Genetik.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”.**

## PHYSIOGENETIC RESPONSES IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum L*) AGAINST WATER STRESS PERIODIC

Student Name : Desy Dwi Nurcahyani  
ID student : 1515 201 202  
Supervisor : Dr. Dewi Hidayati M.Si  
Co-Supervisor : Dr. Nurul Jadid, M.Sc.

### ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) is type of plant that popular in Indonesia because of their economic value industrial field. Water stress periodic is one of the factors that influence tobacco growth. This study aims to determine the physio-genetic response of tobacco. Physiological aspects observed in this study include photosynthesis rate, chlorophyll content and Nitrate Reductase Activity (ANR). While the genetic aspect observed the expression of responsive genes, such as *NtADHI* and *NtACSI* during water stress. The treatment given is water periodic stress that start from waterlogging treatment followed by flooding treatment. The results showed that in waterlogging stress conditions, jepon emas variety has the best response to the parameter of photosynthesis rate by  $103 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ANR by  $1.77 \mu\text{mol/hr}$ , and an increase of expression Level both genes. In flooding stress condition, jinten variety has the best response to photosynthetic rate parameter by  $113.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , chlorophyll content by  $0.54 \text{ mg/l}$ , ANR by  $2.79 \mu\text{mol/hr}$ . Jinten variety are performed an augmentation of *NtADHI* Expression Level compared with control. The most sensitive varieties to waterlogging and flooding stress demonstrated by the manilo and P951 varieties, respectively.

**Keyword:** *Nicotiana tabacum*, Gene Expression, Waterlogging, Flooding, Physiologi, Genetic.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”.**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis yang berjudul “Respon Fisiogenetik Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap cekaman genangan periodik”.

Penyusunan Tesis ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari banyak pihak. Oleh sebab itu penulis menyampaikan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu yaitu:

1. Ketua Departemen Biologi ITS atas dukungan dan arahan kepada penulis.
2. Dr. Dewi Hidayati M.Si. sebagai dosen pembimbing pertama dan Dr. Nurul Jadid M.Sc sebagai dosen pembimbing kedua yang selalu memberikan semangat, waktu, serta bimbingan dalam menyusun laporan tesis ini.
3. Mukhamad Muryono M.Si. Ph.D dan Dr. Techn.. Endry Nugroho P. M.T. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan penulisan laporan tesis ini supaya menjadi lebih baik.
4. Laboratorium Molekuler RSPTI Surabaya yang telah mendukung terlaksananya analisa molekuler dalam penelitian ini.
5. Laboratorium Biosains dan teknologi tumbuhan ITS yang telah memfasilitasi penggunaan bahan kimia dan alat instrumen dalam penelitian ini.
6. Serta semua pihak yang mendukung lancarnya pelaksanaan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tesis ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran yang membangun sangat berarti bagi penulis. Penulis berharap semoga Tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca. Akhir kata, semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan hidayahNya kepada kita semua. Amin.

Surabaya, 28 Januari 2018

Desy Dwi Nurcahyani

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”.**

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN .....	i
ABSTRAK .....	iii
<i>ABSTRACT</i> .....	v
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	3
1.3. Batasan Masalah .....	3
1.4. Tujuan Penelitian .....	4
1.5. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI</b>	
2.1 Karakteristik Tembakau .....	5
2.1.1 Klasifikasi Tembakau .....	6
2.1.2 Morfologi Tembakau Varietas Manilo .....	6
2.1.3 Morfologi Tembakau Varietas Jinten .....	6
2.1.4 Morfologi Tembakau Varietas Jepon Emas.....	7
2.1.5 Morfologi Tembakau Varietas P95I .....	7
2.2 Cekaman Genangan .....	7
2.3 Respon Fisiologis Tanaman terhadap Cekaman Genangan.....	9
2.3.1 Fotosintesis .....	10
2.3.2 Transpirasi.....	12
2.3.3 Aktifitas Nitrat Reductase .....	13
2.4 Ekspresi Gen-gen Responsif terhadap Cekaman Genangan .....	14
2.4.1 ACCSynthase .....	15
2.4.2 ADH1 .....	17
2.4.3 Gen Referensi Elongation Factor I $\alpha$ ( <i>NtEF-I<math>\alpha</math></i> ) .....	18
2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) <i>Real Time</i> .....	19
<b>BAB III METODA PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	21
3.2 Persiapan, Penanaman, Pemeliharaan Bibit Tanaman Tembakau .....	21
3.3 Pemberian Cekaman Genangan Tahap 1 .....	22
3.4 Pemberian Cekaman Genangan Tahap 2 (Tahap Periodik).....	22
3.5 Pengukuran Parameter Fisiologis Tanaman Tembakau.....	22

3.5.1 Laju Fotosintesis.....	22
3.5.2 Kandungan Klorofil.....	22
3.5.3 Kadar Aktifitas Nitrat Reductase (ANR) .....	23
3.6 Pengukuran Parameter Molekuler Tanaman Tembakau .....	23
3.6.1 Desain Primer .....	23
3.6.2 Ekstraksi RNA Total .....	24
3.6.3 Kuantitatif Konsentrasi RNA Total .....	25
3.6.4 PCR <i>Real Time</i> .....	26
3.6.5 Analisis Hasil PCR <i>Real Time</i> .....	26
3.7 Rancangan Penelitian .....	27
3.8 Analisa Data .....	27
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Respon Fisiologis Tanaman Tembakau terhadap Cekaman Genangan Periodik .....	31
4.1.1 Laju Fotosintesis.....	32
4.1.2 Kandungan Klorofil.....	35
4.1.3 Kadar Aktifitas Nitrat Reductase (ANR) .....	37
4.2 Respon Ekspresi RNA gen-gen responsif terhadap Cekaman Genangan Periodik .....	39
4.2.1 <i>NtADHI</i> .....	40
4.2.2 <i>NtACSI</i> .....	42
4.3 Respon Varietas Pada Parameter Fisiologi dan Genetik.....	43
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran .....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN .....	53

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1 Tabel Sekuens Primer .....	24
Tabel 3.2 Tabel Komponen RT-PCR.....	26
Tabel 3.3 Tabel Pengamatan Cekaman Tahap 1 .....	28
Tabel 3.3 Tabel Pengamatan Cekaman Tahap 2.....	28
Tabel 4.1 Tabel Penilaian Respon tiap Varietas Tembakau terhadap Cekaman Genangan Periodik .....	31
Tabel 4.2 Ekspresi relatif <i>NtADHI</i> varietas tembakau ketika tercekam genangan periodik .....	40
Tabel 4.3 Ekspresi relatif <i>NtACSI</i> varietas tembakau ketika tercekam genangan periodik .....	42

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman Tembakau .....	6
Gambar 2.2 Jenis Cekaman Genangan.....	8
Gambar 2.3 Proses Reduksi oleh Nitrat Reductase.....	13
Gambar 2.4 Proses Ekspresi gen .....	15
Gambar 2.5 Skema Struktural Biosintesis Etilen.....	16
Gambar 2.7 Respirasi Anaerob .....	18
Gambar 4.1 Grafik Laju Fotosintesis Varietas Tembakau pada Perlakuan Genangan Periodik.....	32
Gambar 4.2 Akar Tanaman Tembakau.....	34
Gambar 4.3 Grafik Kandungan Klorofil Varietas Tembakau pada perlakuan genangan periodik.....	35
Gambar 4.4 Gejala Klorosis pada Daun Tembakau ketika Tercekam Genangan .....	36
Gambar 4.5 Grafik Aktifitas <i>nitrat reductase</i> (ANR) varietas tembakau pada perlakuan genangan periodik.....	37

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil uji anova two way Laju Fotosintesis .....	53
Lampiran 2. Hasil uji anova two way Kandungan Klorofil .....	57
Lampiran 3. Hasil uji anova two way aktifitas nitrat reductase .....	61
Lampiran 4. Hasil pengamatan ANR .....	65
Lampiran 5. Hasil pengukuran kadar klorofil .....	67
Lampiran 6. Foto Perlakuan genangan Periodik .....	69

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan jenis tanaman yang sangat di kenal di Indonesia karena perannya yang cukup besar dalam bidang perekonomian. Di Indonesia sebagian besar tembakau dimanfaatkan untuk memenuhi kebutuhan industri rokok, akan tetapi seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) sudah banyak dimanfaatkan sebagai pestisida, energi briket batang tembakau (Pesevski *et al*, 2010), hingga dimanfaatkan sebagai pewarna alami kain sutra (Kusumastuti, 2008). Prospek kebutuhan pasar tembakau yang masih cukup baik perlu diikuti dengan peningkatan hasil dan kualitas tanaman pada budidaya tembakau.

Iklm memegang peranan penting dalam penentuan keberhasilan produksi suatu tanaman. Kondisi iklim yang tidak menentu saat ini menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan tembakau. Menurut data BMKG tahun 2016 musim di pulau Jawa sedang mengalami musim kemarau basah yaitu musim kemarau yang tetap diselingi hujan dengan intensitas rendah dan tinggi. Dengan adanya musim basah atau sulitnya memprediksi curah hujan tersebut akan mempengaruhi pertumbuhan tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*). Keseimbangan air adalah faktor iklim utama yang mempengaruhi kondisi tanaman tembakau, terbukti banyak tembakau yang layu hingga membusuk. Hal ini terjadi karena terlalu banyak air yang diserap, sementara tanaman tembakau tidak membutuhkan banyak air (Trirahardjo, 2016).

Hujan yang turun pada musim kemarau perlu dicermati para petani tembakau, sebab hal itu menyebabkan kualitas tanaman tembakau turun dan menyebabkan kondisi tercekam genangan. Salah satu adaptasi terbaik tanaman terhadap cekaman genangan adalah terjadinya perubahan proses biokimia dan metabolisme yang umumnya terjadi pada saat ketersediaan O<sub>2</sub> terbatas sehingga memungkinkan terjadinya proses metabolisme penghasil energi tanpa oksigen di bawah kondisi anaerob (Dat *et al*, 2004). Menurut Penelitian Ghobadi (2010) menjelaskan peningkatan durasi cekaman genangan dapat menurunkan

pertumbuhan dan hasil tanaman gandum. Dari hasil penelitiannya menunjukkan bahwa tanaman gandum yang tercekam genangan selama 30 hari menurunkan jumlah biji hingga sebesar 44,4 persen.

Cekaman genangan terdiri dari beberapa tingkatan yaitu cekaman genangan yang hanya terjadi pada sistem perakaran (*waterlogging*), cekaman genangan yang merendam semua akar dan sebagian batang tanaman (*partial submergence*) dan seluruh bagian tanaman terendam air (*complete submergence*) (Striker, 2012). Dampak cekaman genangan mempengaruhi karakter morfologi yaitu munculnya akar adventif, dari karakter anatomi munculnya jaringan aerenchym (Colmer, 2003). Dari segi fisiologi menyebabkan penutupan stomata, meningkatnya kadar karbondioksida eksternal yang diikuti dengan menurunnya laju fotosintesis, laju transpirasi, kandungan klorofil, serta mengganggu proses jalur metabolisme tanaman karena adanya defisit oksigen yang disebabkan oleh genangan (Striker, 2012). Penelitian Rakhman (2016) membandingkan 4 varietas tanaman tembakau yaitu Jepon Palakean, Manilo, Jinten, dan marakot didapatkan hasil pada aspek morfologi, Jepon Pelakean memiliki respon lebih baik pada parameter tinggi tanaman, panjang akar, diameter batang, lebar daun dan jumlah akar adventif dibanding ketiga varietas uji lain. Rerata penutupan stomata tertinggi pada Manilo (95,2%), penurunan klorofil tertinggi terjadi pada Manilo sebesar (41,5%), dan berat kering tertinggi oleh Jepon Pelakean sebesar (1,17 mg).

Kondisi tanaman yang tercekam genangan disebut kondisi anoksia. Tanaman merespon kondisi anoksia dengan meregulasi sintesis protein khusus dalam kondisi anaerob (Polipeptida Anaerobik/ANPS) yang menyebabkan meningkatnya aktivitas enzim ADH (Alcohol dehidrogenase) sehingga akumulasi ethanol bertambah dan menyebabkan pembusukan akar. Hal ini dapat terjadi karena terganggunya mekanisme transport fotosintat serta air dan mineral dalam jaringan pengangkut tanaman (Ta Liao & Ho Lin, 2001).

Respon fisiologis yang muncul lainnya ialah dapat berupa meningkatnya regulasi hormon etilen yang memiliki peran penting dalam respon kekurangan oksigen pada tanaman, pembentukan akar adventif dan berkaitan erat dengan prekusornya ACC (Asam 1-aminosiklopropana-1-karboksilat) (Salazar, 2015).

Semua itu memerlukan regulasi genetik yang spesifik, oleh karena itu pengukuran parameter fisiologis dan regulasi genetik respon tanaman terhadap gen yang mengatur fisiologisnya dapat dilihat dari pengaturan ekspresi gen pengkode *NtADHI* dan *NtACSI*

Respon fisiologi dan genetika molekuler umumnya bersifat spesifik. Setiap varietas tanaman dapat memiliki mekanisme yang berbeda dalam merespon kondisi cekaman (Mercuriani, 2006). Hasil dari studi fisiologi dan genetik tersebut selanjutnya dapat dijadikan sebagai sumber informasi sekaligus sebagai sumber genetik untuk pengembangan varietas tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang toleran terhadap cekaman genangan. Dengan adanya hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon fisiogenetik 4 varietas tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) ketika dalam kondisi tercekam genangan.

## **1.2 Perumusan Masalah**

1. Bagaimana respon fisiologis tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) terhadap cekaman genangan secara periodik.
2. Bagaimana respon genetik tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) terhadap cekaman genangan secara periodik..

## **1.3 Batasan Masalah**

1. Parameter fisiologi yang diukur adalah laju fotosintesis, laju transpirasi, kandungan klorofil dan ANR.
2. Respon genetik empat varietas tembakau yang diamati adalah ekspresi gen yang diduga terlibat dalam mekanisme respon terhadap cekaman genangan, meliputi gen *NtADHI* dan *NtACSI* (*ACC syntase*). *Gene of reference* yang digunakan adalah *NtEF- I $\alpha$* .
3. Tingkat ekspresi gen dianalisa menggunakan metode qRT-PCR (quantitative Real Time-PCR).
4. Varietas tembakau yang digunakan ialah varietas manilo, jinten, jepon emas, dan P95I.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui respon fisiologis tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) terhadap cekaman genangan secara periodik.
2. Mengetahui respon genetik tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) terhadap cekaman genangan secara periodik.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi bagi program pemuliaan tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan menyediakan informasi sumber genetik tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang toleran terhadap genangan serta memberikan bahan kajian toleransi terhadap cekaman genangan bagi para peneliti dalam pengembangan studi selanjutnya.

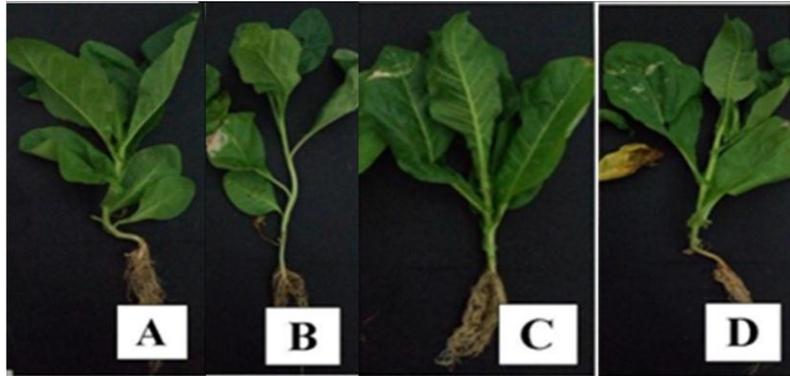
## **BAB 2**

### **KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI**

#### **2.1 Karakteristik Tembakau**

Tembakau memiliki batang tunggal yang tegak yang diakhiri oleh suatu perbungaan. Daunnya bangun bulat telur (ovale) dan lanset memanjang ( oblong lanceolate) dengan luas berkisar 6 dm<sup>2</sup> pada daun bawah , 18 dm<sup>2</sup> daun tengah dan 12 dm<sup>2</sup> daun atas. Berdasarkan ukuran biji sekitar 13.000 biji/g, kepekaan terhadap cahaya saat perkecambahan membutuhkan kejenuhan cahaya yang rendah (Kishore, 2014).

Tanaman ini merupakan tumbuhan herbacius tahunan. Secara umum memiliki sistem akar bercabang. Batang tembakau berbentuk silindris serta memiliki panjang internode yang berbeda tiap jenisnya. Ukuran daun bervariasi dari 15cm hingga mencapai 100cm atau lebih (Kishore, 2014). Menurut Aswati (2006) tembakau dapat tumbuh dengan baik pada lahan yang memiliki karakteristik diantaranya membutuhkan curah hujan rata-rata 100mm/bulan, ketinggian daerah 200 mdpl-2000 mdpl, pH tanah antara 5,5 – 6,5. Kondisi tanah gembur, mudah mengikat air, memiliki tata air dan udara yang baik sehingga dapat meningkatkan drainase. Pada kondisi tanaman normal pemanenan daun dapat dilakukan pada usia 60-70 hari setelah tanam. Lama masa panen adalah 40-50 hari sebanyak 5-7 kali pemetikan tergantung keadaan tanaman dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan (Dirjen Perkebunan, 2012). Tembakau berasal dari Amerika selatan dan Tengah. Biji tembakau mengandung 35-38% nikotin. Dimana dapat digunakan sebagai bahan sabun dan pewarna.



Gambar 2.1. Tanaman Tembakau. Keterangan Gambar (A:Var.Manilo, B:Var. Jinten, C: Var. Jepon Emas, D: Var. P95I)(Dok.Pribadi).

### 2.1.1 Klasifikasi Tembakau

- Regnum : Plantae  
 Divisio : Magnoliophyta  
 Classis : Magnoliopsida  
 Ordo : Solanales  
 Familia : Solanaceae  
 Genus : Nicotiana  
 Species : *Nicotiana tabacum* var. Manilo  
                   *Nicotiana tabacum* var. Jinten  
                   *Nicotiana tabacum* var. Jepon Emas  
                   *Nicotiana tabacum* var. P95I

(Kishore, 2014).

### 2.1.2 Morfologi Tembakau Varietas Manilo

*Nicotiana tabacum* varietas Manilo merupakan salah satu tembakau rakyat (jawa). Tembakau Varietas manilo memiliki habitus silindris dan tinggi sekitar 33 cm. Batang berwarna hijau kekuningan dan berbulu, berdiameter 0,72 cm. Daun berjumlah sekitar 6, panjang daun mencapai 14 cm, lebarnya 10 cm berbentuk memanjang ujung bulat dan bertepi berombak.

### 2.1.3 Morfologi Tembakau Varietas Jinten

*Nicotiana tabacum* varietas Jinten merupakan salah satu tembakau rakyat (jawa). Tembakau Varietas jinten memiliki habitus silindris dan tinggi sekitar 31 cm. Batang berwarna hijau kekuningan dan berbulu, berdiameter 0,60 cm. Daun

berjumlah sekitar 9, panjang daun mencapai 21 cm, lebarnya 9 cm berbentuk bulat ujung cembung dan bertepi berombak.

#### **2.1.4 Morfologi Tembakau Varietas Japon Emas**

*Nicotiana tabacum* varietas Japon emas merupakan salah satu tembakau kasturi, tembakau yang diolah secara di krosok lembaran daunnya. Tembakau Varietas japon emas memiliki habitus piramid dan tinggi sekitar 37,5 cm. Batang berwarna hijau kekuningan dan berbulu, berdiameter 0,80cm. Daun berjumlah sekitar 6, panjang daun mencapai 16 cm, lebarnya 7 cm berbentuk memanjang ujung runcing dan bertepi berombak.

#### **2.1.5 Morfologi Tembakau Varietas P95I**

*Nicotiana tabacum* varietas P95I merupakan varietas unggul baru hasil persilangan antara tembakau madura dengan varietas oriental. Varietas ini memiliki habitus piramid dan tinggi sekitar 36,5 cm. Batang berwarna hijau kekuningan dan berbulu, berdiameter 0,93 cm. Daun berjumlah sekitar 7, panjang daun mencapai 22 cm, lebarnya 11 cm berbentuk bulat ujung cembung (bulat telur) dan bertepi agak berombak.

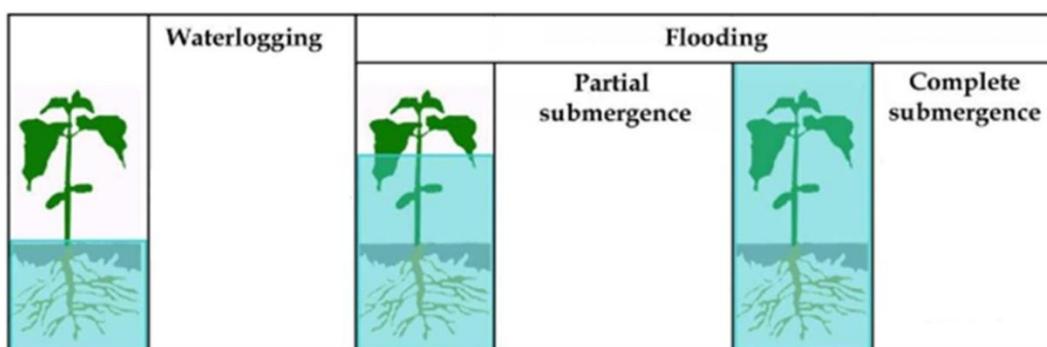
## **2.2 Cekaman Genangan**

Pengaruh buruk kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan terhadap hasil pertanian salah satunya ialah cekaman. Cekaman dalam biologis merupakan segala perubahan kondisi lingkungan yang mungkin akan menurunkan atau merugikan pertumbuhan atau perkembangan tumbuhan sebagaimana fungsi normalnya. Cekaman pada tanaman biasanya diukur dalam akumulasi biomasa atau dengan proses-proses asimilasi primer (seperti: penyerapan CO dan mineral) yang berpengaruh terhadap seluruh pertumbuhan. Kondisi lingkungan yang berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan suatu tanaman belum tentu juga berpengaruh buruk terhadap tanaman yang lain. Kemampuan tanaman menghadapi kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhannya disebut sebagai resistensi/toleransi tanaman (Suwignyo, 2007).

Cekaman Genangan berupa flooding atau banjir adalah gangguan alami yang mempengaruhi produksi tanaman budidaya di seluruh dunia dan memberikan efek merugikan (Colmer & Vosenek, 2009). Kelebihan air menyebabkan terjadinya

penurunan proses pertukaran gas antara jaringan tanaman dan atmosfer disekitarnya, karena gas (khususnya oksigen) berdifusi 10.000 kali lebih lambat di dalam air dibandingkan dengan di udara. Kondisi ini menyebabkan terjadinya hipoksia atau anoksia di sekitar perakaran. Oksigen sangat berperan dalam proses metabolisme yang menghasilkan energi di dalam sel, sehingga konsentrasi oksigen yang sangat rendah di perakaran menyebabkan terganggunya aktivitas metabolik dan produksi energi (Wegner, 2010). Sehingga hambatan pertama untuk pertumbuhan tanaman yang tergenang adalah kekurangan oksigen yang dibutuhkan untuk mempertahankan respirasi aerobik dari jaringan yang terendam.

Cekaman genangan sering digunakan untuk menggambarkan situasi yang berbeda dimana terjadi kelebihan air yang berkisar dari tanah tersaturasi oleh air (yaitu waterlogging) sampai kolom air yang dalam menyebabkan penggenangan seluruh tanaman. Waterlogging merupakan kondisi jenuh pada pori-pori tanah oleh air, dan menutup seluruh permukaan tanah tanpa terlihat adanya lapisan air di atasnya. Pada kondisi ini hanya sistem akar dari tanaman yang berada dalam kondisi anaerob yang disebabkan oleh kekurangan oksigen, sedangkan tunasnya dalam kondisi normal atmosfer. Flooding adalah situasi di mana ada lapisan air di atas permukaan tanah, lapisan air ini bisa dangkal atau dalam, sehingga menimbulkan terendamnya sebagian atau lengkap bagian tanaman.



Gambar 2.2. Jenis Cekaman Genangan (Striker, 2012).

Pada kondisi partial submergence, selain akar mereka sepenuhnya terendam sebagian tunas tanaman juga terendam di dalam air. Kondisi complete submergence, tanaman menghadapi tahap paling stres karena keduanya, tunas dan

akar tanaman berada di bawah air dan dalam hal ini kemungkinan untuk menangkap oksigen di atmosfer dan melanjutkan fiksasi karbon tidak dapat berlangsung (Vashist et al., 2011).

Pada dasarnya air merupakan kebutuhan mutlak bagi tanaman untuk berbagai aktivitas metabolisme di dalam tanaman. Namun demikian, pada saat ketersediaan air berlebihan sehingga tanaman menjadi tergenang atau terendam akan menyebabkan proses metabolisme terganggu. Beberapa kondisi yang mempengaruhi antara lain terjadi karena (Jackson and Ram, 2003):

1. Laju pertukaran gas yang rendah: Hal ini terjadi karena adanya koefisien difusi gas yang rendah ke dalam air ( $0,21 \text{ cm}^2 \text{ det}^{-1}$  di udara menjadi  $2,38 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ det}^{-1}$  di dalam air). Dalam kondisi air yang tidak bergerak kondisi diseliling jaringan tanaman juga menjadi kurang baik.
2. Pengaruh naungan: Penurunan intensitas cahaya yang diterima daun akibat terjadinya proses penaungan. Sinar matahari menjadi tidak sepenuhnya dapat menyentuh tanaman, akibat terhalang oleh adanya genangan air yang terjadi pada air yang jernih apalagi pada air yang keruh.
3. Kerusakan mekanis: Daun akan mengalami kerusakan fisik akibat laju aliran air yang deras atau akibat benturan partikel yang bergerak di dalam air.
4. Kapasitas bahan terlarut: Dalam kondisi tergenang, air akan melarutkan banyak bahan partikel yang bisa bermanfaat tetapi juga dapat berbahaya bagi tanaman.  $\text{CO}_2$  terlarut yang rendah berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman, khususnya akibat rendahnya produksi karbohidrat.

### **2.3 Respon Fisiologis Tanaman terhadap Cekaman Genangan**

Respon tanaman terhadap kondisi tergenang juga menyebabkan adanya perubahan proses menuju terbentuknya protein dan enzim yang terlibat dalam proses fermentasi. Ditemukan 20 polipeptida anaerobik (*anaerobic polypeptides*, ANPs) pada akar jagung yang lingkungannya diubah dari aerobik menuju

anaerobik. Secara keseluruhan, terdapat tiga tahapan proses respon tanaman terhadap kondisi defisit oksigen (Dennis *et al.*, 2000), yaitu:

1. Tahap pertama (0 – 4 jam): terjadi proses induksi yang cepat atau aktivasi signal komponen transduksi.
2. Tahap kedua (4 – 24 jam): proses adaptasi metabolik. Pada tahap ini berlangsung induksi glikolisis dan gen fermentasi yang penting untuk menjaga keberlangsungan produksi energi. Respon metabolik pada tahap ini lebih kompleks dari yang diduga karena melibatkan perubahan dalam metabolisme nitrogen. Pada tahap ini juga dihasilkan enzim yang berperan dalam biosintesis etilen, yaitu aminocyclopropane carboxylic acid synthase (ACC synthase).
3. Tahap ketiga (24 – 48 jam): Tahap ini sangat penting bagi keberlangsungan hidup tanaman ketika dalam kondisi tingkat O<sub>2</sub> yang rendah dilingkungannya, yaitu pembentukan aerenchyma di perakaran. Pasca terendam, tanaman padi mengalami kondisi normal secara mendadak, dan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif akibat adanya kelompok O<sub>2</sub> reaktif seperti: O.

Dennis *et al.* (2000) menyebutkan bahwa proses adaptasi tanaman dapat berlangsung dalam tiga cara yang menghasilkan etanol dan asam laktat. Dalam kondisi suplai oksigen yang normal, fermentasi tidak berlangsung. Proses fermentasi yang diinduksi oleh oksigen yang rendah menunjukkan adanya suatu mekanisme *survival* yang cepat dari tanaman.

Kondisi ini menyebabkan terjadinya kerusakan membran seluler dan organel akibat adanya oksidasi asam pitat tak jenuh pada membran *lipid bilayer*, sehingga terjadi kebocoran membran yang berpengaruh terhadap proses respirasi mitokondria dan fiksasi karbon di kloroplas (Suwignyo, 2007).

### **2.3.1 Fotosintesis**

Fotosintesis meliputi reaksi oksidasi dan reduksi, dimana proses keseluruhan adalah oksidasi air (pemindahan elektron disertai pelepasan O<sub>2</sub> sebagai hasil samping) dan reduksi CO<sub>2</sub> untuk membentuk senyawa organik, misalnya karbohidrat. Fotosintesis menggunakan energi cahaya untuk mengangkut elektron menjauhi H<sub>2</sub>O menuju penerima elektron yang lebih lemah.

Respon yang umum terhadap genangan adalah pengurangan fiksasi karbon tanaman, yaitu laju fotosintesis. Dalam jangka pendek, fotosintesis bisa turun sebagai hasil pembatasan penyerapan CO<sub>2</sub> akibat penutupan stomata. Penutupan stomata ketika kondisi genangan dapat terjadi sebagai respons terhadap dehidrasi daun dimana sel-sel penjaga kehilangan tekanan turgor (Striker et al., 2007). Dalam kasus terakhir, Bukti yang ada mendukung gagasan penutupan stomata yang dimediasi oleh peran asam absisat (ABA) pada daun, namun tidak di sintetis dan diangkut dari akar, seperti yang terjadi di bawah cekaman kekeringan. Jika genangan terus berlanjut, penurunan kapasitas fotosintesis sel mesofil per sel akan menyebabkan pengurangan fotosintesis lebih lanjut. Kapasitas fotosintesis yang rendah tersebut dapat dikaitkan dengan kandungan klorofil pada daun (Manzur et al., 2009).

Sebagai tambahan, penggunaan foton yang rendah dari tanaman yang tergenang dapat menghasilkan produksi spesies oksigen reaktif (ROS). ROS utama adalah superoksida, oksigen tunggal, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil, yang sangat reaktif dan memicu kerusakan selaput lipid dan protein. Untuk mengelola tingkat ROS dalam sel, tanaman memiliki antioksidan seperti askorbat, glutathione dan tocopherol, dan enzim (yaitu peroksidase, superoksida dismutase, glutathione reduktase, katalase) dengan kemampuan mengais ROS dan meregenerasi antioksidan. Namun, di bawah cekaman genangan, aktifitasnya menjadi lebih lambat karena produksi ROS yang lebih tinggi, sehingga menimbulkan kerusakan oksidatif pada protein aparatus fotosintesis (Yordanova et al., 2004). Ketika dinaikkan, efek negatif dari genangan pada fotosintesis dari tingkat daun ke tingkat tanaman dapat menyebabkan pertumbuhan tanaman yang rendah. Seperti penurunan pertumbuhan, menyebabkan rendahnya kebutuhan fosfat triose untuk biosintesis sukrosa dan juga memperlambat transportasi floem gula (Sachs & Vartapetian, 2007). Akibatnya, pati mulai terakumulasi dalam kloroplas. Selain itu, mempercepat proses *senescence* dan pengurangan luas daun sehingga menyebabkan penurunan fiksasi karbon pada tanaman (Striker et al., 2012). Dalam hal ini, tanaman harus memanfaatkan cadangan karbohidrat mereka untuk menjaga aktivitas metaboliknya.

### 2.3.2 Klorofil

Klorofil merupakan pigmen pemberi warna hijau pada tumbuhan, alga dan bakteri fotosintetik. Pigmen ini berperan dalam proses fotosintesis tumbuhan dengan menyerap dan mengubah energi cahaya menjadi energi kimia. Sifat fisik klorofil adalah menerima dan atau memantulkan cahaya dengan gelombang yang berlainan (berpendar = berfluoresensi). Klorofil banyak menyerap sinar dengan panjang gelombang antara 400-700 nm, terutama sinar merah dan biru. Sifat kimia klorofil, antara lain (1) tidak larut dalam air, melainkan larut dalam pelarut organik yang lebih polar, seperti etanol dan kloroform; (2) inti Mg akan tergeser oleh 2 atom H bila dalam suasana asam, sehingga membentuk suatu persenyawaan yang disebut *feofitin* yang berwarna *coklat* (Dwidjoseputro, 1994).

Klorofil merupakan faktor utama yang mempengaruhi fotosintesis serta menjadi pigmen utama yang terdapat dalam kloroplas. Tiga fungsi utama klorofil dalam proses fotosintesis adalah memanfaatkan energi matahari, memicu fiksasi CO untuk menghasilkan karbohidrat dan menyediakan energi bagi ekosistem secara keseluruhan. Karbohidrat yang dihasilkan dalam fotosintesis diubah menjadi protein, lemak, asam nukleat dan molekul organik lainnya. Klorofil dapat menampung cahaya yang diserap oleh pigmen lainnya melalui fotosintesis, sehingga klorofil disebut sebagai pigmen pusat reaksi fotosintesis. Hasil penelitian saputro (2016) menunjukkan bahwa genangan berpengaruh terhadap klorofil daun kedelai. Dimana kadar klorofil daun kedelai kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan genangan. Dalam penelitian dijelaskan bahwa penurunan kandungan klorofil berkaitan dengan akitivitas fotosintesis dimana pembentukan klorofil dihambat dan terjadi penurunan Rubisco pada saat tanaman tergenang.

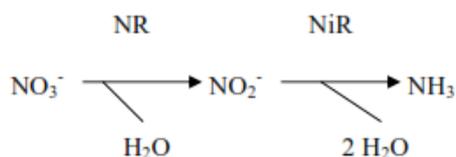
Genangan pada tanah menyebabkan akar tanaman mengalami gangguan respirasi, penyerapan unsur hara dan metabolisme tanaman secara keseluruhan. Berkurangnya unsur hara pada tanaman menyebabkan proses pembentukan klorofil terganggu dan kadar klorofil pada daun menjadi turun (Kosova *et al*, 2011). Selain itu, sintesis klorofil dipengaruhi oleh berbagai faktor salah satunya adalah unsur N dan Mg. Genangan akan menyebabkan pH media tanam cenderung menurun (masam) sehingga menyebabkan serapan N dan Mg menurun dan aktivitas mikroorganisme tanah terganggu. Magnesium (Mg) turut berperan dalam

penyusunan zat klorofil. Ion  $Mg^{+}$  merupakan inti dari klorofil. Oleh karena itu, kecukupan Mg sangat diperlukan untuk memperlancar fotosintesis. Gejala visual ketika terjadi gangguan pada magnesium (Mg) ditandai dengan klorosis antar tulang-tulang daun, warna berubah menguning. Selain itu, terdapat bercak-bercak berwarna kecoklatan (nekrosis), sedangkan tulang daun tetap berwarna hijau atau hijau pucat (Saputro, 2016).

### 2.3.3 Aktifitas Nitrat Reductase

Nitrogen merupakan nutrient terbatas utama untuk kebanyakan spesies tanaman. Akuisis dan asimilasi nitrogen merupakan hal terpenting kedua pada fotosintesis untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Salisbury and Ross, 1995). Nitrogen di atmosfer berada dalam bentuk  $N_2$  mengalami oksidasi oleh  $O_2$ . Sebagian kecil  $N_2$  menjadi nitrogen oksida (NO) selanjutnya akan mengalami oksidasi asam menjadi nitrat ( $NO_3^-$ ) melalui air hujan akan masuk ke tanah. Sumber nitrogen lain di atmosfer yaitu amoniak ( $NH_3$ ) dan ion amonium ( $NH_4^+$ ) nitrogen yang berasal dari pembakaran industri, aktivitas gunung berapi dan kebakaran hutan (Anggarwulan dan Solichatun, 2001).

Penyerapan nitrat dan ion amonium memungkinkan tumbuhan untuk membentuk berbagai senyawa protein. Kebanyakan nitrat diserap oleh akar, sedang asimilasi nitrat dari kebanyakan tumbuhan tinggi terjadi di daun. Nitrat sebelum diasimilasi di daun atau akar, harus direduksi menjadi amoniak. Reduksi nitrat pada tumbuhan tinggi terbagi dalam 2 reaksi. Pertama nitrat direduksi menjadi nitrit yang dikatalisis oleh nitrat reduktase (NR), kemudian reaksi yang kedua adalah pengubahan nitrit menjadi ion amonium yang dikatalisis oleh nitrit reduktase (NiR). (Noogle dan Fritz, 1983).



Gambar 2.3. Proses reduksi oleh Nitrat Reduktase (NR) (Noogle & Fritz, 1983).

Nitrat reduktase perlu dipelajari karena aktifitasnya mempengaruhi laju sintesis protein dalam tumbuhan yang menyerap nitrat sebagai sumber nitrogen

utama. Aktivitas nitrat reduktase dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah laju sintesis dan laju perombakan oleh enzim penghancur protein serta penghambat dan penggiat dalam sel. Selama terjadi cekaman air, aktivitas nitrat reduktase turun dengan cepat. Hal ini disebabkan karena adanya penurunan pergerakan nitrat ke daun sebagai akibat dari berkurangnya transpirasi.

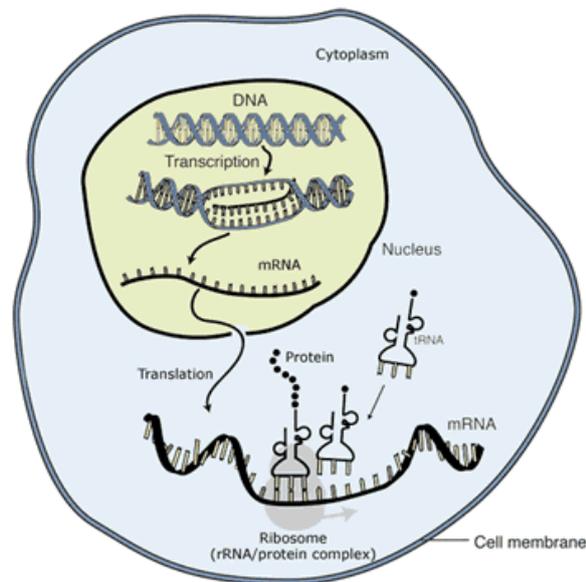
Enzim nitrat reduktase berguna untuk merubah nitrat menjadi nitrit yang kemudian setelah melalui serangkaian kerja enzim lain nitrit ini akan diubah menjadi asam amino dan protein yang terlibat dalam metabolisme. Aktivitas enzim nitrat reduktase pada tanaman berhubungan dengan hasil tanaman, sehingga tingkat aktivitas enzim nitrat reduktase dapat digunakan sebagai kriteria seleksi untuk memilih genotip dari suatu tanaman yang berdaya hasil tinggi (Alnopri, 2004).

Enzim nitrat reductase tersebar disemua sel tumbuhan, baik di akar, batang maupun daun. Aktivitas nitrat reduktase lebih besar pada daun daripada akar karena proses reduksi nitrat memerlukan energi yang berasal dari proses fotosintesis, serta reduksi nitrit menjadi amonium memerlukan cahaya. Aktifitas enzim nitrat reduktase dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain substrat yang menginduksi produknya sendiri, inhibitor dan faktor lingkungan (salah satunya ialah air). Respon terhadap faktor tersebut mengakibatkan banyaknya enzim nitrat reduktase akan mengalami fluktuasi (Latifa, 2009).

#### **2.4 Ekspresi gen- gen Responsif terhadap Cekaman Genangan**

Gen merupakan bagian dari genom (material genetik) dapat berupa DNA atau RNA dan berfungsi untuk mengontrol perkembangan fisik maupun perilaku dari setiap makhluk hidup. Gen digunakan sebagai model atau ruas penyandi dalam pembentukan protein. Proses penterjemahan sekuen DNA yang terdapat dalam gen menjadi protein disebut sebagai ekspresi gen (Murray, 2003). Ekspresi gen berlangsung melalui beberapa tahapan, yaitu: transkripsi DNA membentuk mRNA, modifikasi pasca transkripsi, dan translasi (penterjemahan mRNA membentuk protein). Proses tersebut kemudian dilanjutkan dengan pelipatan, modifikasi, dan pentargetan protein. Penterjemahan mRNA membentuk protein dapat terjadi karena adanya kode genetik yang dibaca gen-gen yang berperan dalam mekanisme resistensi termasuk didalam kelompok gen-gen yang ekspresinya terinduksi. Gen-

gen tersebut pada umumnya hanya diekspresikan secara berlebih (overexpression) bila tanaman mengalami kondisi cekaman lingkungan tertentu (Mercuriani, 2006).

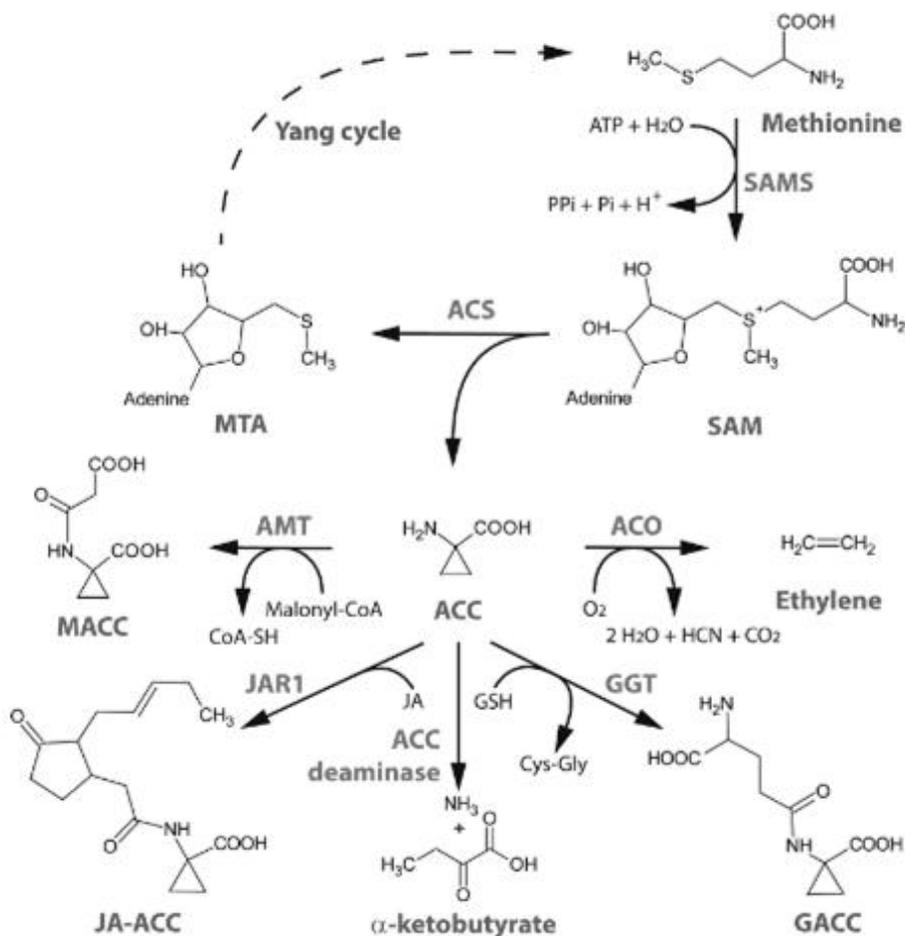


Gambar 2.4. Proses Ekspresi Gen ([www.genome.gov](http://www.genome.gov))

#### 2.4.1 *ACC Synthase*

Etilen adalah salah satu hormon yang berperan penting dalam banyak aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman, termasuk pemasakan buah dan penuaan, serta dalam perkecambahan biji dan pemanjangan akar tanaman. Prekursor ethylene, ACC, dihasilkan dari konversi S-adenosyl-Met oleh ACC synthase (Poel dan Straeten, 2014). Biosintesis etilen pada tanaman secara umum terjadi melalui tiga tahapan utama. Pertama, pembentukan S-adenosil metionin(SAM) dari metionin dengan bantuan SAM sintetase yang membutuhkan 1 molekul ATP. Senyawa SAM merupakan precursor dalam lintasan biosintesis poliamin (spermidin spermin) dan juga donor bagi molekul-molekul selular contohnya asam nukleat, protein, dan lipid. Tahap kedua adalah konversi SAM menjadi *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid* (ACC) yang dikatalisis oleh ACC sintase. Metiltioadenosin (MTA) juga dihasilkan dalam proses pembentukan ACC dan akan digunakan kembali untuk pembentukan metionin, sehingga konsentrasi metionin selular dapat tetap terjaga ketika terjadi peningkatan laju biosintesis etilen. Tahap

terakhir adalah oksidasi ACC menjadi etilen yang dikatalisis oleh ACCoksidase (Wang *et al.*, 2002).



Gambar 2.5. Skema Struktural biosintesis etilen (Wang *et al.*, 2002).

Regulasi biosintesis etilen terletak pada tahap pembentukan ACC oleh ACC sintase. Menurut Wang *et al.* (2002) ACC sintase dapat mengalami fosforilasi secara reversible oleh suatu fosfatase atau kinase yang dapat mempengaruhi derajat aktivitas dari enzim yang bersangkutan. Enzim ACS seperti telah dijelaskan sebelumnya adalah enzim utama yang terlibat dalam tahap regulasi biosintesis etilen, yaitu melalui pengaturan dalam pembentukan ACC.

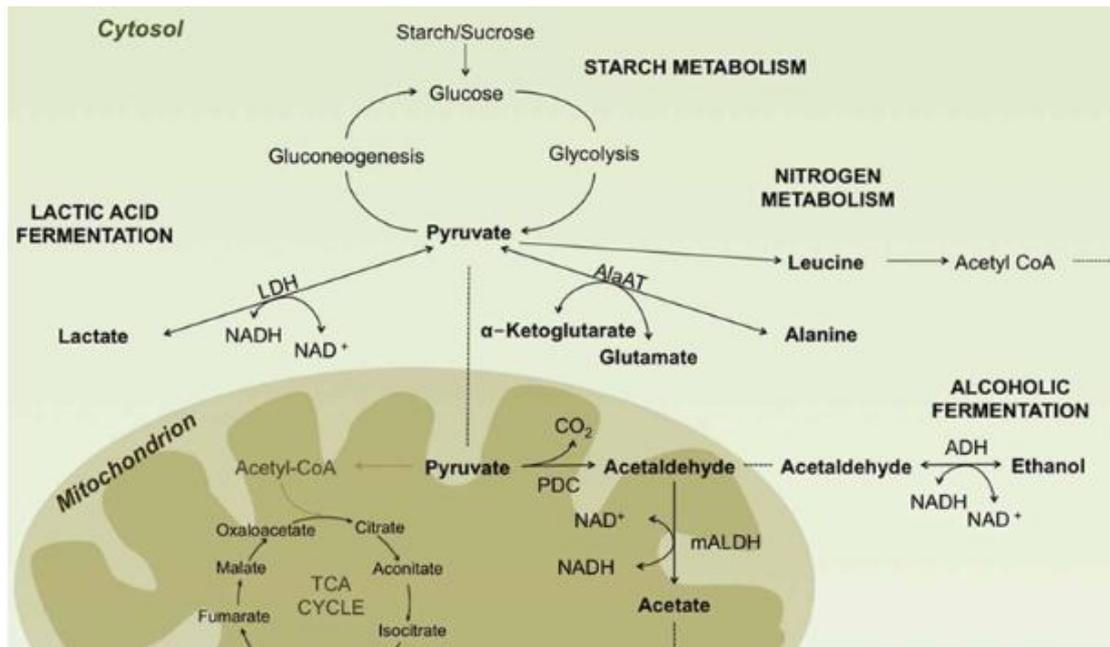
Beberapa ciri umum dari ACS adalah terdapat dalam jumlah kecil dalam jaringan tanaman, bersifat labil dan dapat dinonaktifkan oleh substratnya. Pengamatan struktur kristal ACS dari apel memperlihatkan bahwa ACS memiliki struktur homodimer dengan residu konservasi terletak pada permukaan dimer dan berdekatan dengan sisi aktif enzim (Wang *et al.* 2002). Enzim ACS disandi oleh

suatu family multigenik dan ekspresi dari tiap gen memiliki perbedaan yang dipengaruhi oleh factor perkembangan tanaman, lingkungan, dan faktor hormonal. Beberapa gen ACS yang telah berhasil diisolasi adalah dari tanaman *Arabidopsis*, tomat, apel, kacang hijau, padi, kentang, maupun tembakau.

#### **2.4.2 ADHI**

enzim alkohol dehydrogenase (ADH) mempunyai peran yang sangat penting bagi benih padi untuk berkecambah dalam kondisi tergenang. Pada tanaman yang toleran, ternyata kandungan enzim ADH ini relatif lebih tinggi sehingga lebih tahan terhadap genangan pada fase perkecambahan benih. Untuk melihat perbedaan mekanisme toleransi tanaman padi terhadap genangan, Gibbs *et al.*,(2000) membandingkan dua varietas yang toleran (Calrose) dan tidak toleran (IR22). Hasil penelitian menunjukkan bahwa laju pemanjangan koleoptil dan sintesis etanol lebih tinggi pada Calrose. Varietas Calrose juga menunjukkan tingkat enzim fosfofruktokinase, piruvat dekarboksilase dan alkohol dehidrogenase yang tinggi. Kandungan enzim yang tinggi ini sangat membantu tanaman tersebut untuk menghasilkan substrat yang banyak dalam proses fermentasi.

Fermentasi alkohol adalah jalur fermentasi utama glikolisis pada tanaman anaerob (Komatsu et al. 2010), dan mekanisme toleransi terhadap cekaman genangan mencakup pengaturan gen yang terlibat dalam glikolisis dan fermentasi alkohol. Alkohol dehidrogenase adalah enzim fermentasi enzim yang sangat melimpah di beberapa spesies, dari prokariota untuk jamur, tumbuhan, dan hewan. Pentingnya ADH dalam kondisi cekaman genangan dievaluasi menggunakan kacang hijau, di mana upregulasi sukrosa sintase dan ADH ditemukan ketika dalam kondisi tercekam genangan (Sairam et al., 2009). Tingkat ekspresi ADH sangat terkait dengan toleransi anoksik pada koleoptil padi selama anoksia, aktivitas ADH dan sintesis etanol lebih tinggi dalam varietas yang lebih toleran daripada varietas yang tidak toleran (Katonoguchi Dan Morokuma 2007).



Gambar 2.6. Respirasi Anaerob (Miro, 2013).

Hasil analisis proteome dan transkriptome protein dan gen yang terinduksi ketika kondisi cekaman genangan menunjukkan bahwa ekspresi ADH meningkat secara mencolok pada tahap pertumbuhan kedelai awal sebagai bentuk respon terhadap cekaman (Komatsu et al, 2010).

### 2.4.3 Gen Referensi Elongation Factor 1a (*NtEF-1a*)

Gen referensi yang biasa digunakan untuk menganalisis ekspresi gen tanaman tembakau dengan menggunakan metode Real Time PCR adalah gen *NtEF-1a* (Czechowski et al., 2005) hal ini dikarenakan dalam hasil penelitian menunjukkan bahwa dari kedelapan jenis gen referensi pada tembakau yang memiliki stabilitas ekspresi tertinggi adalah gen *NtEF-1a* (Schmidt et al, 2010). Gen *NtEF-1a* sendiri berfungsi dalam regulasi beberapa proses selular meliputi pertumbuhan, pembelahan, dan transformasi (Negrutski & Elskaya, 1998). Beberapa gen referensi lainnya yang dapat digunakan untuk pengujian dengan *Nicotiana tabacum*, diantaranya adalah 18S rRNA, actin, protein ribosomal L25. Gen *NtEF-1a* sendiri berfungsi dalam regulasi beberapa proses selular meliputi pertumbuhan, pembelahan, dan transformasi.

Analisis ekspresi gen seringkali melibatkan pengukuran tingkat mRNA dengan PCR *Real Time* (juga disebut sebagai *quantitative Reverse Transcriptase-*

PCR atau qRT-PCR). PCR *Real Time* secara signifikan lebih sensitif, spesifik dan kuantitatif diantara kedua teknik tersebut dan telah menjadi metode yang paling sering digunakan untuk validasi hasil *microarray* dan kuantisasi ekspresi gen. Akurasi RT-PCR dipengaruhi oleh sejumlah variabel, termasuk kualitas dan kuantitas *template* mRNA (atau cDNA), variasi dalam efisiensi reaksi, dan perbedaan antara sel-sel atau jaringan. Variabel ini biasanya dikendalikan dengan menormalisasi ekspresi gen dengan ekspresi suatu kontrol internal atau gen referensi. Ekspresi gen referensi harus konstan dalam jaringan atau sel yang digunakan, dan tidak boleh berubah dalam kondisi perlakuan eksperimental.

## 2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) *Real Time*

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik yang berguna dalam amplifikasi suatu sekuen DNA spesifik, dengan bantuan enzim, dan dilakukan secara *in vitro*. Sampai sekarang telah terdapat beberapa pengembangan dari teknik PCR salah satunya ialah PCR *Real Time*. PCR *Real Time* menggabungkan sintesis cDNA dari RNA *template* dengan PCR untuk menyediakan metode yang sensitif dan cepat untuk menganalisis ekspresi gen. PCR *Real Time* digunakan untuk mendeteksi atau mengukur ekspresi mRNA dari konsentrasi RNA target yang kecil. *Template* untuk RT-PCR bisa berupa RNA total atau poli (A) + RNA (Santos *et al.*, 2004).

PCR *Real Time* adalah kombinasi dari tiga langkah, yaitu (i) *reverse transcriptase* (RT) konversi-dependent dari RNA menjadi cDNA, (ii) amplifikasi cDNA menggunakan PCR dan (iii) kuantifikasi dan deteksi produk amplifikasi pada waktu yang sebenarnya (*real time*). PCR *Real Time* menggunakan pewarna fluoresen untuk menggabungkan langkah amplifikasi dan deteksi dari reaksi PCR dalam format tabung tunggal. Pengujian bergantung pada pengukuran peningkatan sinyal fluoresensi, yang sebanding dengan jumlah DNA yang dihasilkan selama setiap siklus PCR.

Reaksi individu ditandai dengan siklus PCR dimana fluoresensi pertama naik di atas fluoresensi yang telah ditentukan atau ambang batas latar belakang (*threshold cycle = Ct*) atau persimpangan titik (*crossing point = Cp*). Makin banyak target yang ada pada bahan awal, semakin rendah Ct. Korelasi antara fluoresensi

dan jumlah produk memungkinkan kuantifikasi akurat dari molekul target selama rentang dinamis yang lebar, sementara tetap mempertahankan sensitivitas dan spesifisitas seperti pada PCR konvensional.

Aplikasi yang paling umum dari PCR kuantitatif adalah analisis ekspresi gen, patogen deteksi/kuantifikasi dan kuantifikasi mikroRNA. Sebagai contoh, pengukuran mRNA sebagai akibat dari perlakuan yang berbeda. Software kuantitatif PCR menggunakan fase eksponensial PCR untuk kuantifikasi. PCR pada awalnya fase eksponensial tapi akhirnya mencapai fase plateau, yaitu ketika salah satu reagen menjadi terbatas. Reaksi dapat menjadi plateau pada tingkat yang berbeda bahkan jika konsentrasi target awal sama. Selama fase eksponensial, jumlah target diasumsikan dua kali lipat setiap siklus dan diharapkan tidak ada bias karena reagen pembatas (Livak, 2001).

## **BAB 3**

### **METODA PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian telah dilakukan pada bulan Maret-September 2017 di PT. Sadhana Purwosari, Greenhouse Fakultas Pertanian Universitas Gajahmada Yogyakarta serta Rumah Sakit Khusus Infeksi Universitas Airlangga Surabaya.

#### **3.2 Persiapan, penanaman dan pemeliharaan bibit tanaman Tembakau**

Bibit tanaman tembakau yang akan digunakan untuk seleksi terhadap cekaman genangan awalnya berupa biji. Dari benih dilakukan perkecambahan dengan cara disemai pada nampan kecil yang terdiri dari media tanam *coco peat* dan kompos (1:1). Kemudian ditambahkan pupuk NPK (5g/lt media) dan disiapkan larutan Ridomil (0,5 g/L air). Semua bahan dicampur merata dan larutan Ridomil ditambahkan hingga media cukup lembab. Bibit yang telah mencapai umur 15-22 hari setelah sebar (HSS) dipindah ke dalam *pottray* yang berisi 72 lubang tanam. Bibit yang dipindah kedalam *pottray* adalah bibit yang telah memenuhi kriteria, yaitu munculnya 3-4 daun. Daun tembakau yang diameternya sekitar 3 cm dilakukan clipping dengan tujuan untuk memperkokoh batang maupun akar dan pemeratakan pertumbuhan. Bibit ditumbuhkan selama 20-25 hari dalam *pottray* untuk kemudian dilakukan penanaman pada *polybag* buntu berisi media tanam yang terdiri dari tanah kompos dan arang sekam dengan perbandingan 2:1 (berat media tanam sebesar 1,5 Kg). Setelah bibit selesai ditanam, dibuat 2 lubang sebagai tempat memasukkan pupuk NPK sebanyak 3 g/ *polybag*.

Pemeliharaan meliputi aklimatisasi yang meliputi 7 hari tanpa penyiraman dan selanjutnya dengan penyiraman hingga bibit berumur 61 HSS atau 26 HST dengan dosis penyiraman air 50 ml/ *polybag* setiap hari (Kurniawan, 2014). Selama aklimatisasi juga dilakukan pencabutan rumput yang tumbuh di *polybag* dan pengendalian hama penyakit dengan menggunakan insektisida organtrin 1,5 ml/L air.

### **3.3 Pemberian Cekaman Genangan Tahap 1**

Perlakuan cekaman genangan dilakukan selama 6 hari dalam container plastic berukuran 40cm x 30cm x 20cm. Perlakuan dilakukan saat tanaman berumur 26 HST di media tanam dengan morfologi 4-5 daun (Kurniawan, 2014). Setiap varietas tanaman diberikan cekaman genangan dengan mengisi air pada *container* setinggi 13 cm hingga tercapainya kondisi bagian akar terendam dan tanah tersaturasi oleh air (*waterlogging*). Ketinggian air pada setiap perlakuan dijaga dan dipertahankan selama 6 hari perlakuan cekaman. Pengecekan volume air pada *polybag* dilakukan setiap harinya.

### **3.4 Pemberian Cekaman Genangan Tahap 2 (Tahap Periodik)**

Setelah perlakuan genangan tahap pertama, perlakuan genangan tahap kedua dilakukan penambahan air pada *container* hingga merendam sebagian batang dan 1-2 daun pertama (*flooding*). Tahap kedua ini juga dilakukan selama 6 hari, sehingga total pemberian cekaman genangan tahap 1 dan cekaman genangan tahap dua ialah selama 12 hari.

### **3.5 Pengukuran Parameter Fisiologi Tanaman Tembakau**

#### **3.5.1 Laju Fotosintesis**

Laju Fotosintesis diukur dengan alat *Photosintetic Analyzer LiCor-6400 Portable Photosyntetic System (Lincoln,NE,USA)*. Pengukuran dilakukan berdasarkan banyaknya CO<sub>2</sub> internal yang digunakan saat pengukuran pada daun tanaman yang dihubungkan dengan Leaf Chamber. Laju fotosintesis diukur langsung pada daun termuda yang terus berkembang (*Youngest fully expanded*) yaitu pada daun kedua dan dilakukan pada hari ke-0,2,4,6,8,10,12 setelah perlakuan (Moradi, 2007).

#### **3.5.2 Kandungan Klorofil**

Daun seberat 1 g dihomogenisasi dan dilarutkan dengan 20 mL acetone 80% di dalam mortar. Selanjutnya ekstrak disaring dengan kertasaring *whatman No. 1* dan larutan dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil. Pengamatan menggunakan panjang gelombang 645 nm dan 663 nm.

Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer dengan persamaan yang digunakan ialah :

$$\text{Klorofil Total} = 8,02 (\text{Absorb.663}) + 20,2 (\text{Absorb.645}) \text{ mg/L}$$

(Hu *et al*, 2013).

### 3.5.3 Kadar Aktifitas Nitrat Reduktase (ANR)

Sampel daun dibersihkan, dihilangkan tulang daun hingga didapatkan berat 2 g. Sampel dimasukkan dalam tabung film yang telah berisi 5 ml buffer fosfat pH 7.0 dan diinkubasi selama 24 jam. Buffer dibuang dan diganti dengan buffer baru sebanyak 5 ml ditambahkan 1 ml NaNO<sub>3</sub> sebagai substrat, tepat pada saat penambahan dihitung sebagai awal waktu inkubasi dan berlangsung selama 2 jam. Disiapkan larutan reagen pewarna yang terdiri dari 0,2 ml 1% Sulfanilamide dalam 3N HCl dan 0,2 ml 0,02% Naphylethylendiamide dalam tabung reaksi. Ditambahkan 0,1 ml filtrat yang diambil dari tabung film, dan ditambahkan 2,5 ml akuades. Dihomogenkan dan larutan dipindahkan ke dalam kuvet, larutan diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nanometer. Untuk mencari nilai aktifitas menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{ANR} = \frac{\text{abs sampel}}{\text{abs stand}} \times \frac{1000}{\text{BB}} \times \frac{1}{\text{WI}} \times \frac{50}{1000}$$

Ket : ANR: Aktifitas Nitrat Reduktase (μmol/jam)

Abs : Absorbansi (nm)

BB : Berat Basah sampel (g)

WI : Waktu Inkubasi (jam)

(Latifa, 2009).

## 3.6 Pengukuran Parameter Molekuler Tanaman Tembakau

### 3.6.1 Desain Primer

Data mengenai sekuens gen yang akan digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari data bank gen yang diperoleh dari NCBI dengan memasukkan kode nomor aksesori dari masing masing Pada penelitian ini menggunakan gen target

yaitu gen *ADH1* (Nomor akses: HE962542), gen *NtACS1* (Nomor akses: NM\_001326261), gen *NtABA2* (Nomor akses: EU123520). Selanjutnya, *coding sequence* (CDS) dari gen tersebut disimpan dalam format fasta untuk selanjutnya digunakan dalam mendesain primer.

Desain primer dibuat menggunakan *software* Primer Quest Tool (Integrated DNA Technologies) <http://sg.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>. CDS yang didapatkan lalu disalin pada kolom Sequence Entry. Kemudian pada Custom Design Parameters dipilih qPCR Intercalating Dyes (Primers only) dan spesifikasi primer diisi sesuai keperluan. Lalu klik Get Assays untuk mendapatkan primer yang diinginkan. Hasil desain primer yang digunakan yaitu:

### 3.1. Tabel Sekuens Primer

No	Gen	Sekuens
1	NtADH1	Forward : TTTGGCTTGGGAGCTGTTGGC Reverse : GCCAATGATCCTAGAAGCCCC
2	NtACS1	Forward : ACTATCGAGCATTTAACCGGG Reverse : GTGCCTAATGGATTTGATGGG

### 3.6.2 Ekstraksi RNA Total

Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan Total RNA Mini Kit (*Plant Geneaid*). Kit terdiri dari beberapa komponen yaitu *RB Buffer*, *PRB Buffer*, *WI Buffer*, *Wash Buffer*, *RNase-free water*, *Filter Column*, *RB Column* dan *2 ml Collection Tube*. Ekstraksi RNA Total dimulai dengan menggiling sampel dengan nitrogen cair. Sampel yang telah digiling dan menjadi serbuk halus kemudian ditransfer ke mikrosentrifuge tube 1,5 ml. Ekstraksi RNA terdiri dari empat langkah, pertama adalah lisis (*Lysis*). 500µl *RB Buffer* dan 5µl βmercaptoethanol ditambahkan pada sampel yang telah digerus. Kemudian dicampur menggunakan vortex kemudian diinkubasi pada 60°C selama 5 menit. Sementara itu tabung filter ditempatkan dalam tabung koleksi 2 ml, kemudian campuran sampel ditransfer ke tabung, lalu dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 1.000 rpm kemudian tabung filter dibuang. Filtrat dengan hati-hati ditransfer ke tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml baru.

Langkah kedua adalah pengikatan RNA (RNA Binding). Etanol absolut sebanyak 250 µl ditambahkan pada filtrat kemudian dikocok kuat-kuat. tabung RB ditempatkan dalam tabung koleksi 2 ml kemudian campuran ditransfer ke Kolom RB. Lalu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Jika campuran tidak bisa mengalir melewati membran kolom RB setelah sentrifugasi, waktu sentrifugasi ditingkatkan sampai lolos sepenuhnya. Cairan dibuang lalu kolom RB ditempatkan kembali dalam tabung koleksi 2 ml.

Langkah ketiga adalah pencucian (*Wash*). Empat ratus µl Buffer W1 ditambahkan ke pusat kolom RB. Lalu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang terdapat pada tabung penampung dibuang dan kolom RB ditempatkan kembali pada tabung penampung 2 ml. Lalu ditambahkan 600 µl *Wash Buffer* (yang telah ditambahkan etanol sebelumnya) ke pusat Kolom RB, disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang terdapat pada tabung penampung dibuang kemudian kolom RB ditempatkan kembali pada tabung penampung 2 ml. Lalu 600 µl *Wash Buffer* (yang telah ditambahkan etanol sebelumnya) ditambahkan ke pusat Kolom RB. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang berada pada tabung penampung dibuang, kemudian kolom RB ditempatkan kembali pada tabung penampung. Kemudian kembali disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan matriks kolom.

Langkah keempat adalah elusi RNA (RNA Elution). Kolom RB yang kering diletakkan dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml bersih. Kemudian ditambahkan 50 µl *RNase free water* menggunakan pipet mikro ke pusat matriks kolom, didiamkan selama minimal 2 menit untuk memastikan air bebas RNase benar-benar diserap, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan RNA yang murni.

### **3.6.3 Kuantifikasi Konsentrasi RNA Total**

Kuantifikasi konsentrasi RNA total dilakukan dengan menggunakan Nano Drop (*Thermo Scientific™ NanoDrop 2000*). Pertama, komputer yang berhubungan dengan Nano Drop dinyalakan dan software dijalankan. Kemudian, tempat sampel pada Nano Drop dilap menggunakan tissue bersih. RNase Free Water diukur terlebih dulu sebagai Blank. Kemudian sampel ditetaskan pada alat

NanoDrop, maka secara otomatis konsentrasi RNA Total akan terdeteksi. RNase Free Water dan sampel yang diteteskan pada alat NanoDrop untuk pengukuran adalah sebanyak 2  $\mu$ l.

### 3.6.4 PCR Real Time

Ekspresi gen dianalisa menggunakan Real Time PCR kuantitatif (qRT-PCR). qRT-PCR dilakukan menggunakan sensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step Kit-Bioline. Beberapa step untuk pengujian qRT-PCR dimulai dari isolasi RNA, sintesis cDNA, RT-PCR hingga analisis data. Langkah pertama ialah mempersiapkan dan mencampur semua komponen reaksi. sensiFAST RT mix harus disimpan di atas es selama penggunaan, dan reaksi-reaksi dilakukan di atas es untuk mencegah sintesis cDNA sebelum waktunya. Dihitung volume yang dibutuhkan pada masing-masing komponen sesuai dengan tabel berikut:

3.2. Tabel Komponen RT-PCR

Komponen	Volume ( $\mu$ l)
- 2x SensiFAST SYBR No-ROX master mix	5
- 10 $\mu$ M Forward primer	0,4
- 10 $\mu$ M Reverse primer	0,4
- Reverse Transcriptase	0,1
- Ribosafe Rnase inhibitor	0,2
- ddH <sub>2</sub> O	1,9
- Template	2
Total	10

Adapun template RNA yang digunakan dalam penelitian ini memiliki konsentrasi 10 ng/  $\mu$ l dari setiap sampel tiap perlakuan. Transfer volume yang telah sesuai hitungan dari qPCR master mix, template, dan primer masing- masing ke dalam PCR tube, ditutup dan disentrifuge dalam waktu singkat di-*spindown*. Siklus PCR yang digunakan adalah sebanyak 39 siklus. Analisis hasil dengan penghitungan Ct yang didapatkan dari PCR *Real Time*.

### 3.6.5 Analisis Hasil PCR Real Time

Data yang didapatkan dari *qRT-PCR* (berupa nilai *Threshold Cycle*) dihitung menggunakan metode Livak. Metode Livak merupakan kuantifikasi relatif berkaitan dengan sinyal PCR dari transkrip target dalam kelompok perlakuan dengan sampel yang lain seperti misalnya kontrol tidak diberi perlakuan. Metode ini adalah cara yang mudah untuk menganalisis perubahan relatif ekspresi gen dari eksperimen *real-time* PCR kuantitatif (Livak & Schmittgen, 2001). Untuk mendapatkan nilai tingkat ekspresi mRNA gen target. Langkah-langkah penghitungan adalah sebagai berikut:

- a. Normalisasi  $C_T$  (gen target) terhadap  $C_T$  (gen referensi)
 
$$\Delta C_T(\text{kalibrator}) = C_T(\text{target kalibrator}) - C_T(\text{referensi kalibrator})$$

$$\Delta C_T(\text{tes}) = C_T(\text{target tes}) - C_T(\text{referensi tes})$$
- b. Normalisasi  $\Delta C_T$  sampel terhadap  $\Delta C_T$  kalibrator
 
$$\Delta C_T = \Delta C_T(\text{tes}) - \Delta C_T(\text{kalibrator})$$
- c. Kalkulasi rasio ekspresi Rasio ekspresi =  $2^{-\Delta \Delta C_T}$

### 3.7 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 macam varietas uji terhadap cekaman genangan periodik pada cekaman *waterlogging* selama 6 hari yang masing-masing memiliki 2 kali ulangan.
2. Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 macam varietas uji terhadap cekaman genangan periodik pada cekaman *Flooding Partial subemergence* selama 6 hari yang masing-masing memiliki 2 kali ulangan.

### 3.8 Analisa Data

Analisa data dilakukan dengan hipotesis sebagai berikut :

H<sub>0</sub> : Cekaman genangan periodik tidak berpengaruh terhadap fisiogenetik tanaman tembakau

H<sub>1</sub> : Cekaman genangan periodik berpengaruh terhadap fisiogenetik tanaman tembakau

Pengamatan dilakukan pada akhir percobaan secara destruktif yang meliputi laju fotosintesis, laju transpirasi, kandungan klorofil daun, dan Aktifitas

Nitrat Reduktase (ANR) daun kemudian data yang diperoleh diuji dengan Analisis Varian (ANOVA) *two Way* (dua faktor) dengan taraf kepercayaan 95%. Dilanjut dengan uji tukey untuk mengetahui perbedaan respon pada parameter setelah diberi perlakuan. Data hasil penghitungan dengan metode Livak dan dianalisa secara deskriptif kuantitatif dan direpresentasikan/ ditampilkan sebagai rasio ekspresi mRNA relatif  $\pm$ SD.

### 3.3 Tabel Pengamatan Cekaman Tahap 1

Sampel	Rerata Laju Fotosintesis ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Rerata Laju Transpirasi ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Rerata Kandungan Klorofil (g/l)	Aktifitas nitrat reduktase (ANR) ( $\mu\text{mol/jam}$ )
W0V1				
W0V2				
W0V3				
W0V4				
W1V1				
W1V2				
W1V3				
W1V4				

Keterangan :

W0V1 : kontrol varietas Manilo

W0V2 : kontrol varietas Jinten

W0V3 : kontrol varietas Jepon Emas

W0V4 : kontrol varietas P951

W1V1 : Perlakuan Varietas Manilo

W1V2 : Perlakuan Varietas Jinten

W1V3 : Perlakuan Varietas Jepon Emas

W1V4 : Perlakuan Varietas P951

### 3.4 Tabel Pengamatan Cekaman Tahap 2

Sampel	Laju Fotosintesis ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Laju Transpirasi ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Kandungan Klorofil (g/l)	Aktifitas nitrat reduktase (ANR) ( $\mu\text{mol/jam}$ )
F0V1				
F0V2				
F0V3				
F0V4				
F1V1				
F1V2				
F1V3				
F1V4				

Keterangan :

F0V1 : kontrol varietas Manilo

F0V2 : kontrol varietas Jinten

F0V3 : kontrol varietas Jepon Emas

F0V4 : kontrol varietas P951

F1V1 : Perlakuan Varietas Manilo

F1V2 : Perlakuan Varietas Jinten

F1V3 : Perlakuan Varietas Jepon Emas

F1V4 : Perlakuan Varietas P951

**“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”**

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Respon Fisiologi Tanaman Tembakau terhadap Cekaman Genangan

Pemberian perlakuan cekaman genangan pada tanaman tembakau memberikan respon yang berbeda tiap varietasnya. Dimana hasil uji anova *two way* menunjukkan pengaruh dari varietas dan perlakuan terhadap laju fotosintesis kandungan klorofil dan ANR tanaman tembakau ketika tercekam genangan periodik.

Tabel 4.1. hasil uji anova *two way* tanaman tembakau pada parameter fisiologi

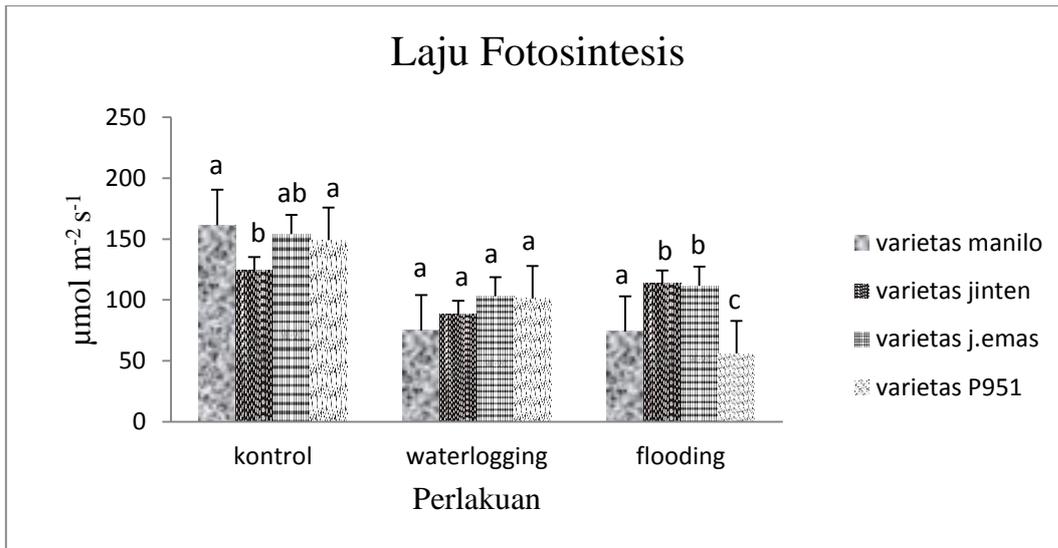
Subyek	Laju Fotosintesis	Kandungan Klorofil	ANR
Varietas	*** (0,00)	** (0,03)	NS (0,20)
Perlakuan	*** (0,00)	*** (0,00)	NS (0,32)
VarietasxPerlakuan	*** (0,00)	NS (0,50)	NS (0,15)

Keterangan : \*\*\* = berpengaruh signifikan (p value =0,00), \*\* = ( p value < 0,05), NS= tidak signifikan (p> 0,05).

Data tabel menunjukkan bahwa perbedaan varietas berpengaruh signifikan pada laju fotosintesis dan kandungan klorofil tanaman tembakau ketika tercekam genangan. Perbedaan perlakuan yang diberikan juga berpengaruh signifikan pada tanaman tembakau ketika tercekam genangan periodik (Tabel 4.1). Pada parameter ANR (Aktifitas Nitrat Reductase) perbedaan varietas dan perbedaan perlakuan tidak berpengaruh signifikan terhadap tanaman tembakau ketika tercekam genangan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara kandungan klorofil dan laju fotosintesis, dimana dalam penelitian Manzur (2009) yang menyebutkan Kapasitas fotosintesis yang rendah tersebut dapat dikaitkan dengan kandungan klorofil yang juga rendah pada daun begitu pula sebaliknya. Penelitian Latifa (2009) menyebutkan bahwa respon aktifitas nitrat reduktase sangat fluktuatif tergantung pada masing-masing individu dan faktor lain.

#### 4.1.1 Laju Fotosintesis

Berdasarkan hasil ANOVA *Two Way* dapat diketahui bahwa interaksi antara faktor varietas dan cekaman genangan periodik (*waterlogging* dan *flooding*) tidak berpengaruh terhadap Laju Fotosintesis dengan nilai *p value* 0,00 ( $p < 0,05$ ).



Gambar 4.1. Grafik Laju Fotosintesis Varietas Tembakau pada Perlakuan Genangan Periodik.

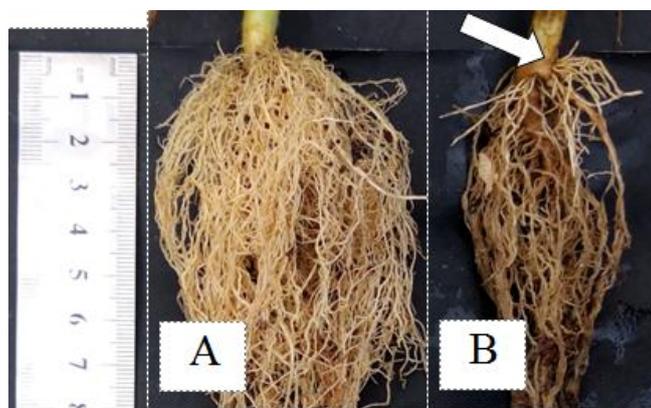
Hasil uji tukey pada kontrol menunjukkan terdapat beda nyata pada laju fotosintesis masing-masing varietas, hal ini menunjukkan bahwa Perbedaan pola ekspresi gen dan respon fisiologis terhadap cekaman sangat bervariasi antar individu yang berbeda, terutama *tolerant* dan *non-torelant* dimana tumbuhan mampu meningkatkan ketahanan cekaman yang berbeda dengan berdasarkan tingkat stres yang diberikan (Zhou *et al*, 2014). Hasil uji tukey menunjukkan bahwa tidak terdapat beda nyata pada semua varietas ketika tercekam genangan *waterlogging*, akan tetapi varietas jepen emas memiliki laju fotosintesis tertinggi sebesar  $103 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . jika dibandingkan dengan ketiga varietas lainnya dan varietas manilo menjadi varietas yang paling sensitif dengan laju fotosintesis sebesar  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Gambar 4.1).

Laju fotosintesis yang terjadi pada kontrol dan perlakuan genangan periodik terlihat sangat berbeda dimana terjadi tren penurunan antara kontrol dan

setelah perlakuan dan menunjukkan pengaruh yang signifikan perlakuan terhadap tanaman tembakau ketika tercekam genangan (tabel 4.1). Dalam jangka pendek striker *et al* (2007) menyebutkan, fotosintesis bisa turun sebagai hasil pembatasan penyerapan CO<sub>2</sub> akibat penutupan stomata. Penutupan stomata bertujuan untuk menjaga O<sub>2</sub> internal sehingga menyebabkan berkurangnya penyerapan CO<sub>2</sub> dari lingkungan ke dalam daun sehingga konsentrasi CO<sub>2</sub> internal berkurang (Caudle dan Maricle, 2012). Berkurangnya ketersediaan CO<sub>2</sub> menyebabkan metabolisme di fotosistem dan peran rubisco dalam siklus calvin terganggu sehingga berpotensi menimbulkan ROS yang dapat menghancurkan membran dan protein.

Pada perlakuan *flooding* varietas jinten yang paling memiliki laju fotosintesis tertinggi sebesar 113,5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dibandingkan dengan varietas lainnya. Terdapat beda nyata antara varietas jinten dengan manilo dan P95I, tetapi tidak ada beda nyata dengan varietas jepon emas walaupun dengan selisih sebesar 29,5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Laju fotosintesis terendah terdapat pada varietas P951 sebesar 56  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (Gambar 4.1). Pada perlakuan *flooding* varietas jinten menjadi varietas yang memiliki respon terbaik dibandingkan dengan varietas lainnya. Hal ini diduga karena mekanisme adaptasi dari tanaman itu sendiri untuk tetap survive ketika dalam kondisi cekaman genangan. Beberapa mekanisme adaptasi pada saat tanaman tercekam genangan ialah dengan munculnya akar adventif. Akar adventif merupakan salah satu akar modifikasi dari epidermis yang berfungsi menggantikan akar yang rusak akibat genangan (Striker, 2012). Beberapa mekanisme adaptasi dijelaskan dalam Yordanova (2004) dimana penggunaan foton yang rendah dari tanaman yang tergenang dapat menghasilkan produksi spesies oksigen reaktif (ROS). ROS utama adalah superoksida, oksigen tunggal, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil, yang sangat reaktif dan memicu kerusakan selaput lipid dan protein. Untuk mengelola tingkat ROS dalam sel, tanaman memproduksi antioksidan seperti askorbat, *glutathione* dan *tocopherol*, dan enzim (yaitu *peroksidase*, *superoksida dismutase*, *glutathione reduktase*, *katalase*) yang mampu mendegradasi ROS dan meregenerasi antioksidan. Namun, di bawah cekaman genangan, aktifitasnya menjadi lebih lambat karena produksi ROS yang lebih tinggi, sehingga menimbulkan kerusakan

oksidatif pada protein fotosintesis. Penurunan laju fotosintesis akan terus terjadi selama terus menerus, tetapi tanaman perlahan akan melakukan adaptasinya dengan tetap memproduksi antioksidan untuk mengurangi ROS. Kapasitas fotosintesis yang rendah tersebut dapat dikaitkan dengan kandungan klorofil pada daun (Manzur et al., 2009). Hal ini dapat dihubungkan dengan hasil uji kandungan klorofil yang didapatkan dimana kandungan klorofil varietas manilo, jinten, jepon emas, dan P95I mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kontrol.

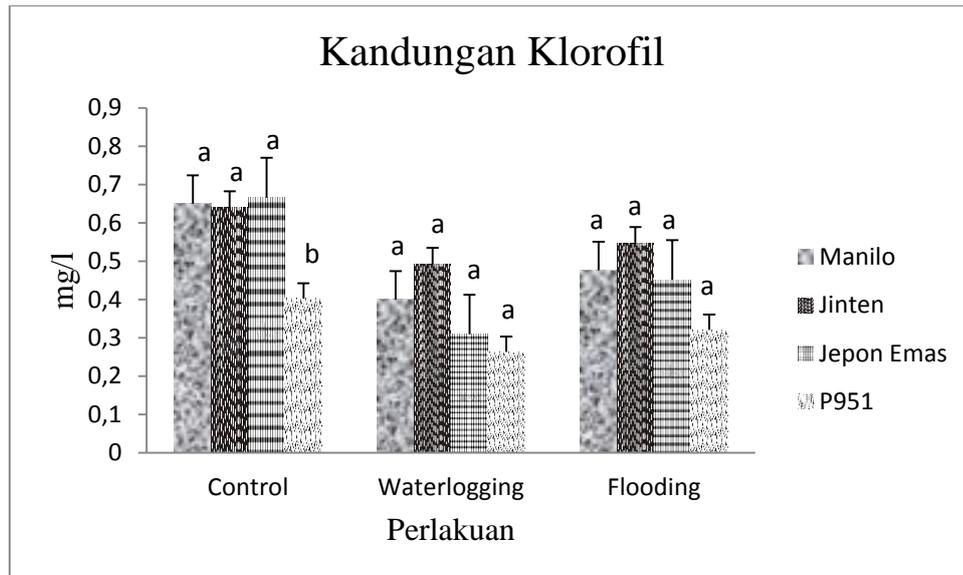


Gambar 4.2. Akar Tanaman Tembakau. (A) Kontrol, (B) Kemunculan Akar Adventif pada perlakuan cekaman periodik.

Tanaman yang toleran lebih mampu untuk memperbaiki aliran energi pada fotosistem II. Mekanisme tanaman toleran terhadap cekaman *waterlogging* maupun *flooding* ialah kemampuan untuk mentranspor  $O_2$  internal menuju jaringan yang tercekam atau tergenang, kemampuan kapasitas aerob yang tinggi dan menjaga kestabilan glikolisis, kemampuan tanaman untuk menjaga stomata tetap terbuka serta menjaga kestabilan laju fotosintesis selama tercekam, dan kemampuan untuk menghindari kerusakan oksidatif dari energi cahaya yang berlebih (Bailey, 2008). Varietas jinten merupakan varietas yang mengalami penurunan laju paling rendah pada perlakuan *waterlogging* dan mengalami kenaikan tertinggi setelahnya pada perlakuan *flooding*. Sedangkan varietas yang mengalami penurunan terbesar adalah varietas P95I baik pada perlakuan *waterlogging* maupun *flooding*.

#### 4.1.2 Kandungan Klorofil

Berdasarkan hasil ANOVA *Two Way* dapat diketahui bahwa interaksi antara faktor varietas dan cekaman genangan periodik (*waterlogging* dan *flooding*) tidak berpengaruh terhadap kandungan klorofil dengan nilai *p value* 0,50 ( $p < 0,05$ ).



Gambar 4.3. Grafik Kandungan Klorofil Varietas Tembakau pada perlakuan genangan periodik.

Hasil tukey menunjukkan terdapat beda nyata pada kontrol antara varietas p951 dengan ketiga varietas lainnya. Perbedaan terjadi menunjukkan adanya respon yang berbeda masing-masing individu. Pada perlakuan *waterlogging* tidak ada beda nyata antara tiap varietasnya. Varietas jinten memiliki kandungan klorofil tertinggi sebesar 0,49 mg/l dibandingkan dengan ketiga varietas yang lain, sedangkan varietas P951 menjadi varietas yang memiliki kandungan klorofil terkecil sebesar 0,26 mg/l (Gambar 4.3). Pada perlakuan *flooding* kandungan klorofil tertinggi ialah pada varietas jinten sebesar 0,54 mg/l, dan varietas terendah adalah p951 0,32 mg/l. Akan tetapi, hasil uji tukey pada perlakuan *flooding* tetap menunjukkan tidak ada beda nyata pada kandungan klorofil tiap varietasnya.

Hasil Anova *two way* menunjukkan pemberian perlakuan berpengaruh signifikan pada kandungan klorofil (Tabel 4.1). Kandungan klorofil tanaman tembakau pada perlakuan genangan periodik terlihat lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian Saputro (2016) menunjukkan bahwa genangan berpengaruh terhadap klorofil daun kedelai.

Genangan pada tanah menyebabkan akar tanaman mengalami gangguan respirasi, penyerapan unsur hara dan metabolisme tanaman secara keseluruhan. Berkurangnya unsur hara pada tanaman menyebabkan proses pembentukan klorofil terganggu dan kadar klorofil pada daun menjadi turun (Kosova *et al*, 2011). Selain itu, sintesis klorofil dipengaruhi oleh berbagai faktor salah satunya adalah unsur N dan Mg (Patel *et al*, 2014). Genangan akan menyebabkan pH media tanam cenderung menurun (asam) sehingga menyebabkan serapan N dan Mg menurun. Magnesium (Mg) turut berperan dalam penyusunan zat klorofil. Ion  $Mg^{+}$  merupakan inti dari klorofil. Oleh karena itu, kecukupan Mg sangat diperlukan untuk memperlancar fotosintesis. Gejala visual ketika terjadi gangguan pada magnesium (Mg) ditandai dengan klorosis antar tulang-tulang daun, warna berubah menguning. Selain itu, terdapat bercak-bercak berwarna kecoklatan (nekrosis), sedangkan tulang daun tetap berwarna hijau atau hijau pucat (Marschner, 2012).



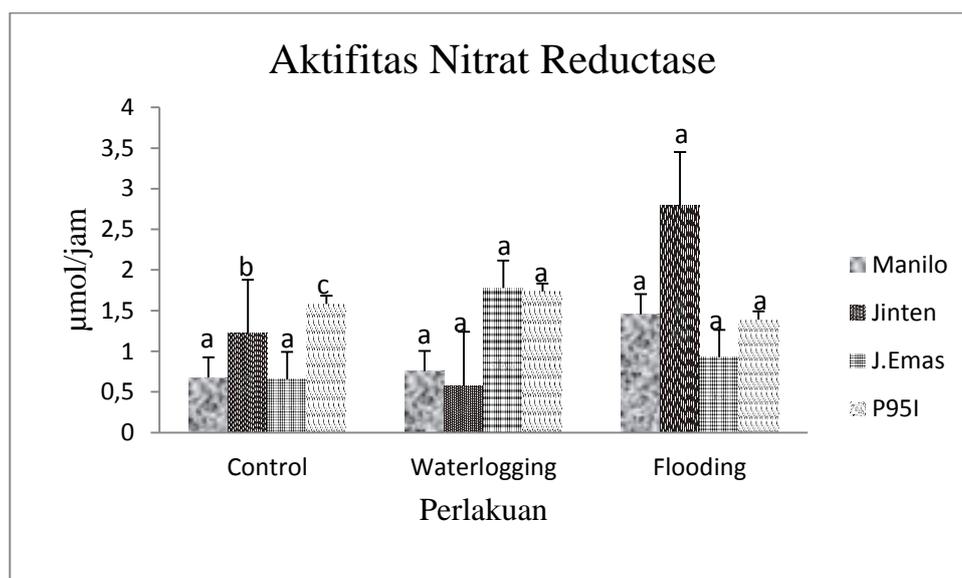
Gambar 4.4. Gejala Klorosis pada Daun Tembakau ketika Tercekam Genangan.

Varietas jinten menjadi varietas respon yang terbaik terhadap cekaman waterlogging dan flooding dibandingkan dengan varietas lainnya, varietas P951 menjadi varietas yang paling sensitif. Tanaman mengalami mekanisme adaptasi

ketika tercekam *waterlogging* sehingga mampu bertahan ketika cekaman dinaikkan menjadi *flooding*. Munculnya akar adventif membantu tanaman mampu menyerap kembali air dan zat hara. Turunnya kadar klorofil juga mempengaruhi laju fotosintesis dimana peran klorofil dalam proses fotosintesis ialah sebagai foton reseptor di fotosistem II dan fotosistem I (Leegood *et al*, 2000). Tren naiknya kandungan klorofil pada cekaman *waterlogging* dan turunnya kandungan klorofil pada cekaman *flooding* relevan dengan tren yang terjadi pada hasil laju fotosintesis di keempat varietas tersebut.

#### 4.1.3 Kadar Aktifitas Nitrat Reductase (ANR)

Berdasarkan hasil ANOVA *Two Way* dapat diketahui bahwa interaksi antara faktor varietas dan cekaman genangan periodik tidak berpengaruh terhadap Aktifitas Nitrat reductase dengan nilai *pvalue* 0,15 ( $p < 0,05$ ).



Gambar 4.5. Grafik Aktifitas *nitrat reductase* (ANR) varietas tembakau pada perlakuan genangan periodik.

Berdasarkan hasil uji tukey terdapat beda nyata pada kontrol yang menunjukkan bahwa masing-masing individu pada kondisi normal memiliki Aktifitas nitrat reductase yang berbeda. Pada perlakuan *waterlogging* varietas jepon emas memiliki ANR yang paling tinggi dibandingkan dengan lainnya sebesar 1,77  $\mu\text{mol/jam}$ , sedangkan varietas jinten memiliki ANR terendah sebesar 0,58  $\mu\text{mol/jam}$  (gambar 4.5). berkebalikan dengan perlakuan *waterlogging*, ANR

pada perlakuan *flooding* tertinggi adalah pada varietas jinten sebesar 2,79  $\mu\text{mol/jam}$ , dan terendah adalah varietas jepon emas 0,92  $\mu\text{mol/jam}$ .

Enzim *nitrat reductase* tersebar disemua sel tumbuhan, baik di akar, batang maupun daun. Aktivitas *nitrat reductase* lebih besar pada daun daripada akar karena proses reduksi nitrat memerlukan energi yang berasal dari proses fotosintesis, serta reduksi nitrit menjadi amonium memerlukan cahaya. Aktifitas enzim *nitrat reductase* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain substrat yang menginduksi produknya sendiri, inhibitor dan faktor lingkungan (salah satunya ialah air). Respon terhadap faktor tersebut mengakibatkan banyaknya enzim nitrat reductase akan mengalami fluktuasi (Latifa, 2009).

Enzim *nitrat reductase* (NR) adalah enzim pertama dalam proses jalur asimilasi nitrat dan merupakan faktor pembatas untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dipengaruhi oleh berbagai macam cekaman lingkungan (Sepher, 2012). ANR yang tinggi pada varietas jinten menunjukkan bahwa varietas tersebut memiliki respon yang baik ketika tercekam genangan dimana Carvalho (2015) menyebutkan ketersediaan nitrat menambah aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga mengurangi pembentukan ROS yang menyebabkan reduksi sel dan kerusakan pada lapisan membran organel. Konversi nitrat menjadi nitrit dapat meregenerasi  $\text{NADP}^+$  dan menggunakan proton. Dengan membutuhkan NADPH sebagai ko substratnya, nitrat dapat mengurangi pembentukan ROS.

Rendahnya Aktifitas Nitrat Reduktase diduga disebabkan karena menurunnya translokasi nitrat dari akar menuju daun hal ini sesuai dengan penelitian (Sepher, 2012) dimana ANR pada daun tanaman jinten menurun jika dibandingkan dengan kontrol. Sintesis ANR sangat di pengaruhi oleh regulasi substratnya. Meskipun ANR pada Varietas jinten, jepon emas serta P951 sempat menurun tetapi ketiga varietas tersebut diduga tetap mempunyai mekanisme untuk adaptasi walaupun dengan kadar NR yang rendah seperti yang dijelaskan bailey (2008) meskipun tanpa peningkatan level NR, menurunnya pH sitosol diduga meningkatkan produksi Nitrit karena dengan pH rendah membuat enzim bekerja optimum.

*Nitrat redustase* (NR) dan *Glutamine synthetase* adalah dua kunci enzim dalam reduksi nitrat dan asimilasi ammonia yang mempengaruhi keseimbangan total nitrogen dan dipengaruhi oleh cekaman genangan (Liao dan Lin, 2001). Cekaman genangan menyebabkan berkurangnya jumlah nutrient endogenous pada tanaman, terjadinya proses senescence pada daun dan terganggunya pertumbuhan di pucuk dikarenakan terhambatnya pengambilan dan distribusi nitrogen (N) di area pucuk (Patel et al, 2014). Kondisi hipoksia/anoksia juga menyebabkan pH sitoplasma menurun yang menginisiasi penghambatan *lactated dehidrogenase* (LDH) dan aktivasi alkohol dehidrogenase (ADH) dimana gen pengkode ADH akan dibahas dalam penelitian ini.

NR dapat digunakan sebagai indeks stres untuk pertumbuhan tanaman didalam tanah dimana nitrat merupakan bentukan utama dari ketersediaan nitrogen bagi tanaman (Sepehr, 2012). Meningkatnya kadar ANR pada varietas manilo,jinten, jepon emas, dan P951 mengindikasikan kemampuan tanaman beradaptasi terhadap cekaman.

#### **4.2 Respon Ekpresi RNA gen responsif terhadap Cekaman Genangan**

Respon tanaman terhadap cekaman baik secara fisiologis maupun molekuler semuanya memerlukan regulasi genetik yang spesifik. oleh karena itu pengukuran parameter fisiologis dan regulasi genetik respon tanaman terhadap gen yang mengatur fisiologisnya dapat dilihat dari pengaturan ekspresi gen beberapa diantaranya pengkode gen *NtADHI* dan *NtACSI*. Ekspresi gen dianalisis pada level transkriptomik menggunakan RNA dan perubahannya dianalisis menggunakan metode *quantitative Real Time* PCR (Wong, 2005). Hasil uji berupa nilai Ct (*threshold cycle*) yang merupakan nilai relatif dari konsentrasi hasil amplifikasi gen target dalam reaksi PCR. Nilai Ct yang didapatkan dianalisis dengan menggunakan metode livak (Livak &Schmittgen, 2001) yang kemudian dinyatakan dalam rasio mRNA relatif.

Analisis data *Real time* PCR dapat menggunakan dua metode yaitu kuantifikasi absolut yang digunakan untuk menentukan jumlah salinan transkrip awal, sedangkan kuantifikasi relatif untuk mendeskripsikan perubahan ekspresi gen target relatif terhadap gen referensi (*housekeeping gene*). Gen referensi yang

digunakan pada penelitian ini ialah *NtEF-Ia* yang merupakan gen pengkode enzim EF-Ia yang esensial untuk sintesis protein, meningkatkan pengikatan GTP-dependen aminoasil tRNA pada ribosom selama fase elongasi translasi (Sturzenbaum&Kille, 2001). *NtEF-Ia* digunakan sebagai gen referensi karena gen tersebut di ekspresikan paling stabil bahkan ketika berada di bawah kondisi cekaman biotik maupun abiotik serta gen ini telah ditetapkan sebagai kontrol invarian yang baik untuk menyesuaikan perbedaan dalam tabung maupun degradasi (Sturzenbaum&Kille, 2001).

#### 4.2.1 *NtADHI*

Tanaman merespon kondisi anoksia/hipoksia dengan merubah pola sintesis protein. Protein disintesis sebagai respon spesifik terhadap kondisi anaerob yang disebut dengan anaerobic polypeptides (ANPs). Salah satu enzim ANPs yang banyak dipelajari adalah ADH. ANP yang terinduksi menunjukkan meningkatnya level mRNA, dan regulasi gen spesifik terjadi pada level sintesis RNA ( Liao and Lin, 2001).

Tabel 4.2 Ekspresi relatif gen *NtADHI* pada beberapa varietas tembakau ketika tercekam genangan periodik.

Perlakuan	Level ekspresi relatif <i>NtADHI</i>			
	manilo	jinten	jepon emas	P951
Kontrol	1,0	1,0	1,0	1,0
waterlogging	2,3	2,9	3,3	0,0
flooding	8,5	19,6	4,3	18,8

Dari hasil menunjukkan bahwa pada perlakuan *waterlogging*, level ekspresi *NtADHI* tertinggi ialah pada varietas jepon emas dengan nilai 3,32 dan terendah adalah varietas P951 dengan nilai 0,05. Pada perlakuan *flooding*, varietas jinten memiliki level ekspresi *NTADHI* tertinggi dengan nilai 19,5 dan varietas jepon emas dengan level ekspresi terendah sebesar 4,33 (Gambar 4.6). Perbedaan ekspresi gen sangat dipengaruhi oleh respon masing-masing individu varietas. Varietas jinten memiliki ekspresi *NtADHI* tertinggi dan diduga memiliki respon

yang baik terhadap cekaman *flooding*. Tingginya ekspresi *NtADH1* menunjukkan tinggi pula enzim ADH yang aktifitasnya sangat penting untuk adaptasi ketika kondisi cekaman genangan (rizal dan karki, 2011).

Fermentasi alkohol adalah jalur fermentasi utama glikolisis pada tanaman anaerob (Komatsu et al. 2010), dan mekanisme toleransi terhadap cekaman genangan mencakup pengaturan gen yang terlibat dalam glikolisis dan fermentasi alkohol. Tingkat ekspresi ADH sangat terkait dengan toleransi anoksik pada koleoptil padi selama anoksia, aktivitas ADH dan sintesis etanol lebih tinggi dalam varietas yang lebih toleran daripada varietas yang tidak toleran (Katonoguchi Dan Morokuma 2007).

Hasil menunjukkan bahwa secara keseluruhan terjadi upregulasi ekspresi relatif *NtADH1* pada masing-masing varietas dari perlakuan *waterlogging* dan *flooding*. Meningkatnya ekspresi gen *NtADH1* sesuai dengan penelitian komatsu (2010) dimana hasil analisis proteome dan transkriptome protein dan gen yang terinduksi ketika kondisi cekaman genangan menunjukkan bahwa ekspresi *adh* meningkat secara mencolok pada tahap pertumbuhan kedelai awal sebagai bentuk respon terhadap cekaman genangan. Ekspresi *adh1* dan *adh2* tanaman jagung juga meningkat pada kondisi hipoksia dalam waktu 4 jam (Liao dan Lin, 2001). Serta dalam penelitian Lee *et al* (2007) dimana gen *NtADH* pada tembakau terinduksi sangat cepat pada saat tercekam genangan.

Selama kekurangan O<sub>2</sub>, *pyruvate decarboxylase* (PDC) merubah piruvat menjadi *asetaldehyde* dan menjadi ethanol dengan bantuan *alcohol dehidrogenase* (ADH) dengan menghasilkan NAD<sup>+</sup> untuk menjaga keberlangsungan glikolisis (Gambar 4.6). Hal ini dibuktikan dengan penelitian pada biji arabidopsis, level induksi ADH di kontrol oleh ativasi dari ROP GTPase. Ketika dalam kondisi kekurangan O<sub>2</sub> terjadi peningkatan ROP aktif, yang menyebabkan transkrip yang mengkode gen ADH dan ROPGAP4, GTP yang menginaktivasi ROP (Bailey, 2008).

pH sitosol pada ujung akar jagung menurun dari 7.5 menjadi 6.8 diikuti dengan kondisi anoksia. Pada perubahan pH inilah terjadi transisi dari fermentasi laktat menuju fermentasi etanol. Menurunnya pH sitosol menguntungkan bagi PDC untuk melakukan aktifitas katalitik secara optimum kemudian membatasi

laktat dan menaikkan produksi etanol. Ketika keadaan anoksia, pada akar jagung yang defisiensi ADH kembali memproduksi laktat dan gagal untuk menstabilkan pH sitosol, yang pada akhirnya meningkatkan asidifikasi pada sitosol dan kematian sel. Jadi perpindahan dari laktat menjadi fermentasi etanol sangat dipengaruhi oleh pH sitosol (Bailey, 2008).

#### 4.2.2 *NtACSI*

*NtACSI* adalah gen yang mengkode enzim ACS (*ACCsynthase*). ACS merupakan enzim utama yang terlibat dalam tahap regulasi biosintesis etilen, yaitu dalam pembentukan ACC (*1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*). Beberapa ciri umum dari ACS adalah terdapat dalam jumlah kecil dalam jaringan tanaman, bersifat labil dan dapat dinonaktifkan oleh substratnya (Wang et al. 2002). Enzim ACS disandi oleh suatu family multigenik dan ekspresi dari tiap gen memiliki perbedaan yang dipengaruhi oleh factor perkembangan tanaman, lingkungan, dan faktor hormonal.

Tabel 4.3 Ekspresi relatif *NtACSI* varietas tembakau ketika tercekam genangan periodik.

perlakuan	Level Ekspresi relatif <i>NtACSI</i>			
	manilo	jinten	jepun emas	P951
control	1,0	1,0	1,0	1,0
waterlogging	0,0	0,0	4,6	0,9
flooding	8,3	0,0	0,2	0,2

Hasil grafik menunjukkan level ekspresi *NtACSI* tertinggi pada perlakuan *waterlogging* adalah varietas jepun emas sebesar 4,61 sedangkan level ekspresi terendah adalah pada varietas jinten sebesar 0,01. Pada perlakuan *flooding*, vlevel ekspresi tertinggi pada varietas manilo sebesar 8,34 dan level ekspresi yang rendah pada ketiga varietas yang lain (gambar 4.7). Meningkatnya ekspresi gen *NtACSI* sesuai dengan penelitian Lee (2007) dimana hasil profiling gen dan protein menunjukkan bahwa *NtACSI* tembakau terekspresi ketika dalam kondisi cekaman genangan.

Biosintesis etilen pada tanaman secara umum terjadi melalui tiga tahapan utama. Pertama, pembentukan S-adenosil metionin(SAM) dari metionin dengan bantuan SAM sintetase yang membutuhkan 1 molekul ATP. Senyawa SAM merupakan precursor dalam lintasan biosintesis poliamin (spermidin spermin) dan juga donor bagi molekul-molekul selular contohnya asam nukleat, protein, dan lipid. Tahap kedua adalah konversi SAM menjadi 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) yang dikatalisis oleh ACCsintase (ACS). Metiltioadenosin (MTA) juga dihasilkan dalam proses pembentukan ACC dan akan digunakan kembali untuk pembentukan metionin, sehingga konsentrasi metionin selular dapat tetap terjaga ketika terjadi peningkatan laju biosintesis etilen. Tahap terakhir adalah oksidasi ACC menjadi etilen yang dikatalisis oleh ACCoksidase (ACO) (Wang et al, 2002). *NtACSI* dapat menunjukkan biosintesis dari ACC yang merupakan prekursor etilen. Dimana etilen sangat berperan dalam proses signalling sel, pembentukan aerenkim dan pembentukan akar adventif untuk proses adaptasi tanaman dalam kondisi tercekam genangan.

Salah satu karakteristik sistem transport ACC adalah translokasi ACC dari akar menuju ke pucuk pada tanaman tomat untuk bertahan ketika kondisi hipoksia. Kekurangan oksigen di rizosphere akan menginduksi ekspresi gen *ACS* pada akar sehingga menyebabkan peningkatan aktifitas enzim ACS. ACC yang berlebihan pada akar tidak di konversi menjadi etilen ketika kondisi kekurangan O<sub>2</sub> dan ketidakhadiran ACO pada akar. ACC di angkut ke dalam xylem dan di transportasikan ke pucuk. Ketika sampai di pucuk ACC di konversi menjadi etilen oleh enzim ACO yang ada pada daun. Terjadi penurunan ekspresi *NtACSI* pada cekaman *waterlogging* dan *flooding* diduga disebabkan karena adanya akumulasi enzim ACO yang lebih banyak di daun, sedangkan dalam beberapa penelitian melaporkan bahwa ACS lebih banyak terdapat di akar (Poel dan Straeten, 2014).

### **4.3 Respon Varietas pada Parameter Fisiologi dan Genetik**

Pada pengamatan parameter fotosintesis didapatkan hasil bahwa varietas jepun emas memiliki respon terbaik terhadap cekaman *waterlogging* dibandingkan dengan varietas lainnya dan varietas jinten menjadi varietas dengan respon terbaik ketika tercekam genangan *flooding* dibandingkan dengan varietas

yang lain. Varietas jinten memiliki respon terbaik pada kandungan klorofilnya baik dalam kondisi cekaman *waterlogging* dan cekaman *flooding* ketika dibandingkan dengan varietas lainnya. Pada parameter ANR varietas jepon emas memiliki respon terbaik ketika dalam kondisi cekaman *waterlogging* dan varietas jinten memiliki respon terbaik ketika dalam kondisi cekaman *flooding* dibandingkan dengan varietas yang lain.

Hasil dari ekspresi relatif gen *NtADHI* pada keempat varietas secara keseluruhan menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi *NtADHI*. Varietas yang mengalami peningkatan level ekspresi gen *NtADHI* paling tinggi ialah jepon emas pada perlakuan *waterlogging* dan varietas jinten pada perlakuan *flooding* dibandingkan dengan varietas lainnya. Pada ekspresi *ntACSI* terjadi ekspresi relatif yang cukup berbeda pada masing-masing varietas. Level ekspresi relatif *NtACSI* pada perlakuan *waterlogging* adalah varietas jepon emas dan varietas manilo pada perlakuan *flooding*.

Perbedaan pola ekspresi gen dan respon fisiologis terhadap cekaman sangat bervariasi antar individu yang berbeda, terutama *tolerant* dan *non-tolerant* dimana tumbuhan mampu meningkatkan ketahanan cekaman yang berbeda dengan berdasarkan tingkat stres yang diberikan (Zhou *et al*, 2014).

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Pada kondisi cekaman *waterlogging*, varietas jepon emas memiliki respon terbaik terhadap parameter laju fotosintesis, kandungan klorofil dan ANR. Pada kondisi cekaman *flooding*, varietas jinten memiliki respon terbaik terhadap parameter laju fotosintesis, kandungan klorofil, dan ANR. Varietas Manilo menjadi varietas yang paling sensitif pada perlakuan *waterlogging*, dan varietas P951 menjadi varietas yang paling sensitif pada perlakuan *flooding*.
2. Varietas jepon emas dan jinten memiliki level ekspresi gen responsif tertinggi pada cekaman genangan periodik.

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan analisa ekspresi gen responsif pada parameter laju fotosintesis kandungan klorofil dan ANR terhadap cekaman genangan periodik yang lain agar diperoleh pemahaman yang lebih komprehensif tentang mekanisme respon varietas jinten dan jepon emas serta perlu dilakukan analisa akibat cekaman genangan periodik terhadap parameter lain , seperti morfologi, kadar etilen, kadar ethanol, dan lainnya.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan“.**

## DAFTAR PUSTAKA

- Alnopri. 2004. *Modifikasi Rancangan Dalil Untuk Mendapatkan Kopi Arabika Unggul Berdasarkan Aktivitas Nitrta Reduktase*. Jurnal Akta Agrosia, 7 (2). 3-8
- Anggarwulan E, & Solichatun. 2001. *Fisiologi Tumbuhan*. Fmipa Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Aswati,Tuti. 2006. *Standar Teknis Budidaya Komoditas Perkebunan, Informasi Perkebunan* .Bandung : Dinas Perkebunan Jawa barat.
- Bailey- Serres, J., Dan Voesenek, L., A., C., J. 2008. *Flooding Stress: Acclimations And Genetic Diversity*. Annu. Rev. Plant Biol. 2008. 59:313–39.
- Carvalho, P., A., Lira, J., M., S., Oliveira, L., E., M., Carvalho, J., N., Dominiciano., D., Dan Cardenas, H., B., W. 2015. *Nitrate Addition Improves Photosynthesis And Flooding Tolerance Of Rubber Tree Plants*. Australian Journal Of Crop Science 9(7):684-689.
- Caudle, K.L. And Maricle, B.R. 2012. *Effects Of Flooding On Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence, And Oxygen Stress In Plants Of Varying Flooding Tolerance*. Transactions Of The Kansas Academy Of Science 115:5–18.
- Colmer, T.D. & Voesenek L.A.C.J. (2009). *Flooding Tolerance: Suites Of Plant Traits In Variable Environments*. *Functional Plant Biology* 36, 665–681.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., & Scheible, W.R. 2005. *Genome-Wide Identification And Testing Of Superior Reference Genes For Transcript Normalization In Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139:5–17.
- Dat, J.F., N. Capelli, H. Folzer, P. Bourgeade, & P.M. Badot. 2004. *Sensing And Signalling During Plant Flooding*. *Plant Physiology And Biochemistry*, 42:273-282
- Dennis, Es, R. Dolferus, M. Ellis, M. Rahman, Y. Wu, F.U. Hoeren, A. Grover, K.P. Ismond, A.G. Good, & W.J. Peacock. 2000. *Molecular Strategies For Improving Waterlogging Tolerance In Plants*. *J. Exp. Bot.* 51(342):89-97.

- Dirjen Perkebunan. 2012. *Pedoman Teknis Penanganan Pascapanen Tembakau*. Jakarta, diakses tanggal 18 September 2017 pukul 06.14WIB
- Ghobadi, M. E., & Ghobadi, M. (2010). *Effect Of Anoxia On Root Growth And Grain Yield Of Wheat Cultivars*. World Academy Of Science Engineering And Technology, 70, 85–88.
- Gibbs, J., S. Morrell, A. Valdez, T.L. Setter & H. Greenway. 2000. *Regulation Of Alcoholic Fermentation In Coleoptiles Of Two Rice Cultivars Differing In Tolerance To Anoxia*. J. Exp. Bot. 51(345):785-796.
- Hu, X., Tanaka, A., & Tanaka, R. 2013. *Simple Extraction Method that Prevent the Artifactual Conversion of Chlorophyll to Chlorophyllide During Pigment Isolation From Leaf Sample*. Plant Method, 9:19
- Hsu, F.-C., Chou, M.-Y., Peng, H.-P., Chou, S.-J., & Shih, M.-C., 2011. *Insights Into Hypoxic Systemic Responses Based On Analyses Of Transcriptional Regulation In Arabidopsis*. Plos One 6: E28888.
- Huang, G.-T., Ma, S.-L., Bai, L.-P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Liu, J., Zhong, M., & Guo, Z.-F., 2012. *Signal Transduction During Cold, Salt, And Drought Stresses In Plants*. Mol. Biol. Rep. 39: 969-987.
- Igamberdiev, A., U., Baron, K., Little, N., M., Stoimenova, M., Dan Hill, R., D. 2005. *The Haemoglobin/Nitric Oxide Cycle: Involvement In Flooding Stress And Effects On Hormone Signalling*. Annals Of Botany 96: 557–564.
- Jackson, M.B., & P.C. Ram. 2003. *Physiological And Molecular Basis Of Susceptibility And Tolerance Of Rice Plants To Complete Submergence*. Annals Of Botany 91:227-241.
- Kato-Noguchi H, & Morokuma M. 2007. *Ethanollic Fermentation And Anoxia Tolerance In Four Rice Cultivars*. J Plant Physiol 164:168–173
- Kishore, K. 2014. *Monograph Of Tobacco (Nicotiana Tabacum)*. Indian Journal Of Drugs 2(1), 5-23
- Komatsu S, Yamamoto R, Nanjo Y, Mikami Y, Yunokawa H, & Sakata K: A.. 2009. *Comprehensive Analysis Of The Soybean Genes And Proteins Expressed Under Flooding Stress Using Transcriptome And Proteome Techniques*. J Proteome Res, 8:4766–4778.

- Kosova, K., Vitamvas, P., Prasil, I.T., & Renaut, J. 2011. *Plant Proteome Changes Under Abiotic Stress—Contribution Of Proteomics Studies To Understanding Plant Stress Response*. *J Proteom* 74: 1301–1322.
- Latifa., I., C & Anggarwulan., E. 2009. *Nitrogen content, nitrate reductase activity, and biomass of kimpul (Xanthosoma sagittifolium) on shade and nitrogen fertilizer variation*. *Nusantara Bioscience* 1: 65-71.
- Leegood, R., C. 2002. *C4 Photosynthesis Rinciples Of CO<sub>2</sub> Concentration And Prospects For Its Introduction Into C3 Plants*. *Journal Of Experimental Botany* 53: 581-590.
- Livak, K. J. And Schmittgen, T. D. 2001. *Analysis Of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr And The 2<sup>-ΔΔct</sup> Method*. *Methods* 25: 402–408.
- Makino, A. 2011. *Rubisco And Nitrogen Relationships In Rice: Leaf Photosynthesis And Plant Growth*. *Soil Science And Plant Nutrition*, 49:3, 319-327.
- Manzur, M.E., Grimoldi, A.A., Insausti, P. & Striker G.G. (2009). *Escape From Water Or Remain Quiescent? Lotus Tenuis Changes Its Strategy Depending On Depth Of Submergence*. *Annals Of Botany* 104, 1163–1169.
- Marschner, P. 2012. *Nutrition Of Higher Plants Third Edition*. Academic Press Elsevier:Uk.
- Mercuriani, I, S,. 2006. *Isolasi Gen-Gen Pada Tanaman Yang Ekspresinya Diinduksi Oleh Cekaman Lingkungan*. Seminar Nasional Mipa 2006 Dengan Tema” Penelitian, Pendidikan, Dan Penerapan Mipa Serta Peranannya Dalam Peningkatan Keprofesionalan Pendidik Dan Tenaga Kependidikan” Fmipa Uny, Yogyakarta.
- Millborrow., B.,V. 2001. *The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis*. *Journal of Experimental Botany* ( 52): 359
- Moradi F, Ismail Am. 2007. *Responses Of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence And Ros-Scavenging Systems To Salt Stress During Seedling And Reproductive Stages In Rice*. *Ann Bot.* 99:1161–1173.

- Noggle Gr, Fritz Gi. 1983. *Introductory To Plant Physiology*. Prentice-Hall. New Jersey.
- Patel, P., K., Singh, A., K., Tripathi, N., Yadav, D., Dan Hemantaranjan., A. 2014. *Flooding: Abiotic Constraint Limiting Vegetable Productivity*. *Advanced Plants Agriculture Research* 1(3): 00016.
- Pesevski, M.D., Iliev, B.M., Zivkovic, D.L., Popovska T.T.J., Srbinoska, M.A., & Filiposki, B.K. 2010. *Posibilites For Utilization Of Tobacco Stem For Production Of Energetic Briquette*. *Journal Of Agriculture Sciences* 55(1): 45-54
- Poel., B., V., D., & Straeten., V., D. 2014. *1-aminocyclopropane-1carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene*. *The Discovery of ACC* (5):640
- Putra, E.T.S., W. Zakaria, N.A.P. Abdullah & G.B. Saleh. 2012. *Stomatal Morphology, Conductance And Transpiration Of Musa Sp. Cv Rastali In Relation To Magnesium, Boron, And Silicon Availability*. *American Journal Of Plant Physiology*, 7(2):84-96.
- Rakhman, Y., R. 2016. *Respon Cekaman Genangan periodik Pada beberapa Varietas Nicotiana Tabacum*. Undergraduate Thesis, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Riquelme, A., Dan Hinrichsen, P. 2015. *Non-Symbiotic Hemoglobin And Its Relation With Hypoxic Stress*. *Chilean Journal Of Agricultural Research* 75 (Suppl. 1).
- Rizal, G., Dan Karki, S. 2011. *Alcohol Dehydrogenase (Adh) Activity In Soybean (Glycine Max [L.] Merr.) Under Flooding Stress*. *Lectronic Journal Of Plant Breeding*, 2(1):50-57.
- Sachs, M. & Vartapetian, B. (2007). *Plant Anaerobic Stress I. Metabolic Adaptation To Oxygen Deficiency*. *Plant Stress* 1, 123–135.
- Sairam, R.K., D. Kumutha, & K. Ezhilmathi. 2009. *Waterlogging Tolerance: Nonsymbiotic Haemoglobinnitric Oxide Homeostatis And Antioxidants*. *Curr. Sci.* 96:674-682.

- Salazar, Carolina., Cristian, Hernandez., & Maria, Teresa Pino. 2015. *Plant Water Stress: Associations Between Ethylene And Abscisic Acid Response*. Chilean Journal Of Agricultural Research 75.
- Santosa, E.K. & Kusumastuti, A. 2008. *Pemanfaatan Daun Tembakau Untuk Pewarnaan Kain Sutra Dengan Mordan Jeruk Nipis*. Teknobunga 01(01): 15-24.
- Saputro, T, B, & Fatimah, V,S,. 2016. *Respon Karakter Fisiologis Kedelai (Glycine Max L.) Varietas Grobogan Terhadap Cekaman Genangan*. Jurnal Sains Dan Seni Its 5(2)2337-3520.
- Schmidt,G., & Sven, K.D. 2010. *Stable Internal Reference Genes For Normalization Of Real-Time Rt-Pcr In Tobacco (Nicotiana Tabacum) During Development And Abiotic Stress*. Mol Genet Genomics. 283:233–241.
- Sepehr, M., F., Ghorbanli, M., Dan Amini, F. 2012. *The Effect Of Water Stress On Nitrate Reductase Activity And Nitrogen And Phosphorus Contents In Cuminum Cyminum L*. Pak. J. Bot., 44(3): 899-903.
- Sosse, A., B., Gerard, B., Binet, P., Touissant, Ml., Dan Badot, Pm. 2005. *Influence Of Flooding On Growth, Nitrogen Availability In Soil, And Nitrate Reduction Of Young Oak Seedlings (Quercus Robur L.)*. Ann. For. Sci. 62 (2005) 593–600.
- Striker, G.G. & Mworja,J. 2012. *Botany - Flooding Stress On Plants : Anatomical, Morphological And Physiological Responses*. Argentina : Ifeva-Conicet, Faculty Of Agronomy, University Of Buenos Aires.
- Stoimenova,M., Igamberdiev, A., U., Gupta, K., J., Dan Hill, R., D. 2007. *Nitrate-Driven Anaerobic Atp Synthesis In Barley And Rice Mitochondria*, Planta 226, 465-474.
- Sturzenbaum Sr., & Kille P. 2001. *Control Genes In Quantitative Molecular Biological Techniques: The Variability Of Invariance*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 130:281–289.
- Suwignyo, R, A,. 2007. *Ketahanan Tananam Padi Terhadap Kondisi Terendam: Pemahaman Terhadap Karakter Fisiologis Untuk Mendapatkan Kultivar*

- Padi Yang Toleran Di Lahan Rawa Lebak* .Kongres Ilmu Pengetahuan Wilayah Indonesia Bagian Barat Palembang
- Liao, C. & Lin, C. 2001. *Physiological Adaptation Of Crop Plants To Flooding Stress*. Proc. Natl. Sci. Coun. Roc(B) 25(3),148-157
- Trirahardjo , M. 2016. <http://www.timesindonesia.co.id/read/129514/20160729/102344/petani-tembakau-diimbau-bangun-parit-untuk-tampung-air-hujan>/Diakses 16 September 2016 Pukul 08.45 Wib.
- Tuteja, N. 2007. *Abscisic Acid And Abiotic Stress Signaling*. Plant Signaling & Behavior 2(3): 135-138.
- Vashisht, D., Hesselink, A., Pierik, R., Ammerlaan, J.M.H., Bailey–Serres, J., Visser, E.J.W., Pedersen, O., Van Zanten, M., Vreugdenhil, D., Jamar, D.C.L., Voeselek L.A.C.J. & Sasidharan, R. (2011). *Natural Variation Of Submergence Tolerance Among Arabidopsis Thaliana Accessions*. New Phytologist 190, 299–310.
- Wang Kl, Li H, Ecker Jr. 2002. *Ethylene Biosynthesis And Signaling Networks*. Plant Cell. 14:131–S151.
- Wegner, L.H. (2010). *Oxygen Transport In Waterlogged Plants*. In *Waterlogging Signalling And Tolerance In Plants*. S Mancuso & S Shabala (Eds). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg Pp. 3–22.
- Xiong L, Zhu Jk.. 2003. *Regulation Of Abscisic Acid Biosynthesis*. Plant Physiol 133: 29–36
- Yordanova, R., Christov, K. & Popova, L. (2004). *Antioxidative Enzymes In Barley Plants Subjected To Soil Flooding*. Environmental & Experimental Botany 51, 93–101.
- Zeppel, M.J.B., C.M.O.Macinnis-Ng, I.A.M. Yunusa, R.J.Whitley Dan D.Eamus. 2008. *Long Term Trends Of Stand Transpiration In A Remnant Forest During Wet And Dry Years*. Journal Of Hydrology (2008) 349:200– 213.
- Zhou, S., Medlyn, B., Sabaté, A., Sperlich, D. and Prentice, I. C. 2014. Short-term water stress impacts on stomatal, mesophyll and biochemical limitations to photosynthesis differ consistently among tree species from contrasting climates. **Tree Physiology** 34: 1035–1046.

## Lampiran 1

### Hasil Anova two way Laju Fotosintesis

Univariate Analysis of Variance Laju Fotosintesis

#### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
perlakuan	1	kontrol	8
	2	waterlogging	8
	3	flooding	8
varietas	1	manilo	6
	2	jinten	6
	3	jepon emas	6
	4	p95l	6

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: fotosintesis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	24714,458 <sup>a</sup>	11	2246,769	72,770	,000
Intercept	286672,042	1	286672,042	9284,924	,000
perlakuan	17329,083	2	8664,542	280,633	,000
varietas	1621,792	3	540,597	17,509	,000
perlakuan * varietas	5763,583	6	960,597	31,112	,000
Error	370,500	12	30,875		
Total	311757,000	24			
Corrected Total	25084,958	23			

a. R Squared = ,985 (Adjusted R Squared = ,972)

Split File

#### Between-Subjects Factors

perlakuan		Value Label	N
Kontrol	perlakuan 1	kontrol	8
		manilo	2
		jinten	2
		jepon emas	2
	4	p95l	2
waterlogging	perlakuan 2	waterlogging	8

	varietas	1	manilo	2
		2	jinten	2
		3	jepon emas	2
		4	p95l	2
Flooding	perlakuan	3	flooding	8
	varietas	1	manilo	2
		2	jinten	2
		3	jepon emas	2
		4	p95l	2

### Multiple Comparisons

fotosintesis

Tukey HSD

perlakuan	(I) varietas	(J) varietas	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
kontrol	manilo	jinten	37,00*	4,330	,004	19,37	54,63
		jepon emas	7,50	4,330	,415	-10,13	25,13
		p95l	12,50	4,330	,138	-5,13	30,13
	jinten	manilo	-37,00*	4,330	,004	-54,63	-19,37
		jepon emas	-29,50*	4,330	,008	-47,13	-11,87
		p95l	-24,50*	4,330	,016	-42,13	-6,87
	jepon emas	manilo	-7,50	4,330	,415	-25,13	10,13
		jinten	29,50*	4,330	,008	11,87	47,13
		p95l	5,00	4,330	,681	-12,63	22,63
	p95l	manilo	-12,50	4,330	,138	-30,13	5,13
		jinten	24,50*	4,330	,016	6,87	42,13
		jepon emas	-5,00	4,330	,681	-22,63	12,63
waterlogging	manilo	jinten	-13,50	7,914	,426	-45,72	18,72
		jepon emas	-28,00	7,914	,077	-60,22	4,22
		p95l	-26,00	7,914	,096	-58,22	6,22
	jinten	manilo	13,50	7,914	,426	-18,72	45,72
		jepon emas	-14,50	7,914	,378	-46,72	17,72

		p95l		-12,50	7,914	,478	-44,72	19,72
	jepon	manilo		28,00	7,914	,077	-4,22	60,22
	emas	jinten		14,50	7,914	,378	-17,72	46,72
		p95l		2,00	7,914	,993	-30,22	34,22
	p95l	manilo		26,00	7,914	,096	-6,22	58,22
		jinten		12,50	7,914	,478	-19,72	44,72
		jepon		-2,00	7,914	,993	-34,22	30,22
		emas						
flooding	manilo	jinten		-39,50*	3,354	,001	-53,15	-25,85
		jepon		-37,50*	3,354	,001	-51,15	-23,85
		emas						
		p95l		18,00*	3,354	,020	4,35	31,65
	jinten	manilo		39,50*	3,354	,001	25,85	53,15
		jepon		2,00	3,354	,928	-11,65	15,65
		emas						
		p95l		57,50*	3,354	,000	43,85	71,15
	jepon	manilo		37,50*	3,354	,001	23,85	51,15
	emas	jinten		-2,00	3,354	,928	-15,65	11,65
		p95l		55,50*	3,354	,000	41,85	69,15
	p95l	manilo		-18,00*	3,354	,020	-31,65	-4,35
		jinten		-57,50*	3,354	,000	-71,15	-43,85
		jepon		-55,50*	3,354	,000	-69,15	-41,85
		emas						

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 11,250.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.



## Lampiran 2

### Data Anova two-way Kandungan Klorofil

Univariate Analysis of Variance kandungan klorofil

#### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
perlakuan	1	kontrol	8
	2	waterlogging	8
	3	flooding	8
varietas	1	manilo	6
	2	jinten	6
	3	jepon emas	6
	4	p95l	6

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: klorofil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,437 <sup>a</sup>	11	,040	5,667	,003
Intercept	5,106	1	5,106	728,134	,000
perlakuan	,227	2	,114	16,187	,000
varietas	,171	3	,057	8,131	,003
perlakuan * varietas	,039	6	,007	,928	,509
Error	,084	12	,007		
Total	5,627	24			
Corrected Total	,521	23			

a. R Squared = ,839 (Adjusted R Squared = ,691)

Split file

#### Between-Subjects Factors

perlakuan			Value Label	N	
kontrol	perlakuan	1	kontrol	8	
		varietas	1	manilo	2
			2	jinten	2
			3	jepon emas	2
			4	p95l	2
waterlogging	perlakuan	2	waterlogging	8	

	varietas	1	manilo	2
		2	jinten	2
		3	jepon emas	2
		4	p95l	2
flooding	perlakuan	3	flooding	8
	varietas	1	manilo	2
		2	jinten	2
		3	jepon emas	2
		4	p95l	2

### Multiple Comparisons

klorofil

Tukey HSD

perlakuan	(I) varietas	(J) varietas	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
kontrol	manilo	jinten	,03	,018	,566	-,05	,10
		jepon emas	-,01	,018	,941	-,08	,06
		p95l	,28*	,018	,000	,20	,35
	jinten	manilo	-,03	,018	,566	-,10	,05
		jepon emas	-,04	,018	,341	-,11	,04
		p95l	,25*	,018	,001	,18	,32
	jepon emas	manilo	,01	,018	,941	-,06	,08
		jinten	,04	,018	,341	-,04	,11
		p95l	,29*	,018	,000	,21	,36
	p95l	manilo	-,28*	,018	,000	-,35	-,20
		jinten	-,25*	,018	,001	-,32	-,18
		jepon emas	-,29*	,018	,000	-,36	-,21
waterlogging	manilo	jinten	-,09	,082	,707	-,42	,24
		jepon emas	,09	,082	,707	-,24	,42
		p95l	,14	,082	,421	-,19	,47
	jinten	manilo	,09	,082	,707	-,24	,42

		jepon		,18	,082	,264	-,15	,51
		emas						
		p95I		,23	,082	,147	-,10	,56
	jepon emas	manilo		-,09	,082	,707	-,42	,24
		jinten		-,18	,082	,264	-,51	,15
		p95I		,05	,082	,923	-,28	,38
	p95I	manilo		-,14	,082	,421	-,47	,19
		jinten		-,23	,082	,147	-,56	,10
		jepon		-,05	,082	,923	-,38	,28
		emas						
flooding	manilo	jinten		-,02	,119	,998	-,50	,46
		jepon		,02	,119	,998	-,46	,50
		emas						
		p95I		,15	,119	,605	-,33	,64
	jinten	manilo		,02	,119	,998	-,46	,50
		jepon		,04	,119	,985	-,44	,52
		emas						
		p95I		,18	,119	,524	-,31	,66
	jepon emas	manilo		-,02	,119	,998	-,50	,46
		jinten		-,04	,119	,985	-,52	,44
		p95I		,13	,119	,689	-,35	,62
	p95I	manilo		-,15	,119	,605	-,64	,33
		jinten		-,18	,119	,524	-,66	,31
		jepon		-,13	,119	,689	-,62	,35
		emas						

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,014.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.



### Lampiran 3

#### Data Anova two-way ANR

#### Univariate Analysis of Variance ANR

##### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
perlakuan	1	kontrol	8
	2	waterlogging	8
	3	flooding	8
varietas	1	manilo	6
	2	jinten	6
	3	jepon emas	6
	4	p95l	6

##### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ANR

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8,602 <sup>a</sup>	11	,782	1,730	,180
Intercept	39,552	1	39,552	87,483	,000
perlakuan	1,615	2	,807	1,786	,209
varietas	1,748	3	,583	1,289	,323
perlakuan * varietas	5,239	6	,873	1,931	,156
Error	5,425	12	,452		
Total	53,580	24			
Corrected Total	14,028	23			

a. R Squared = ,613 (Adjusted R Squared = ,259)

#### Split file

##### Between-Subjects Factors

perlakuan			Value Label	N	
kontrol	perlakuan	1	kontrol	8	
		varietas	1	manilo	2
			2	jinten	2
			3	jepon emas	2
			4	p95l	2
waterlogging	perlakuan	2	waterlogging	8	

	varietas	1	manilo	2
		2	jinten	2
		3	jepon emas	2
		4	p95l	2
flooding	perlakuan	3	flooding	8
	varietas	1	manilo	2
		2	jinten	2
		3	jepon emas	2
		4	p95l	2

### Multiple Comparisons

ANR

Tukey HSD

perlakuan	(I) varietas	(J) varietas	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
kontrol	manilo	jinten	-,55*	,034	,000	-,70	-,41
		jepon emas	,01	,034	,990	-,13	,15
		p95l	-,86*	,034	,000	-1,00	-,72
		jinten	,55*	,034	,000	,41	,70
	jepon emas	manilo	,56*	,034	,000	,42	,71
		jinten	-,31*	,034	,003	-,45	-,16
		manilo	-,01	,034	,990	-,15	,13
		jinten	-,56*	,034	,000	-,71	-,42
	p95l	manilo	-,87*	,034	,000	-1,01	-,73
		jinten	,86*	,034	,000	,72	1,00
		jepon emas	,31*	,034	,003	,16	,45
		jepon emas	,87*	,034	,000	,73	1,01
waterlogging	manilo	jinten	,13	,929	,999	-3,65	3,90
		jepon emas	-,87	,929	,787	-4,65	2,90
		p95l	-,98	,929	,734	-4,75	2,80
		jinten	-,13	,929	,999	-3,90	3,65
		jinten	manilo				

		jepon	-1,00	,929	,720	-4,78	2,78
		emas					
		p95l	-1,10	,929	,666	-4,88	2,68
	jepon emas	manilo	,87	,929	,787	-2,90	4,65
		jinten	1,00	,929	,720	-2,78	4,78
		p95l	-,10	,929	,999	-3,88	3,68
	p95l	manilo	,98	,929	,734	-2,80	4,75
		jinten	1,10	,929	,666	-2,68	4,88
		jepon	,10	,929	,999	-3,68	3,88
		emas					
flooding	manilo	jinten	-1,34	,702	,351	-4,20	1,52
		jepon	,54	,702	,868	-2,32	3,39
		emas					
		p95l	,07	,702	1,000	-2,79	2,93
	jinten	manilo	1,34	,702	,351	-1,52	4,20
		jepon	1,88	,702	,169	-,98	4,73
		emas					
		p95l	1,41	,702	,319	-1,45	4,27
	jepon emas	manilo	-,54	,702	,868	-3,39	2,32
		jinten	-1,88	,702	,169	-4,73	,98
		p95l	-,47	,702	,906	-3,32	2,39
	p95l	manilo	-,07	,702	1,000	-2,93	2,79
		jinten	-1,41	,702	,319	-4,27	1,45
		jepon	,47	,702	,906	-2,39	3,32
		emas					

Based on observed means.

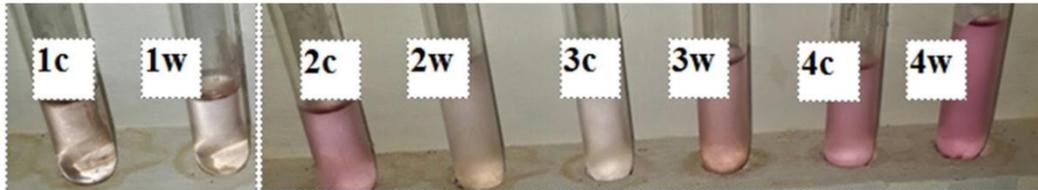
The error term is Mean Square(Error) = ,493.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.



## Lampiran 4

### Hasil pengamatan ANR



Keterangan :

1. Varietas manilo                      c : kontrol
2. Varietas jinten                        w: perlakuan waterlogging
3. Varietas jepon emas
4. Varietas P951



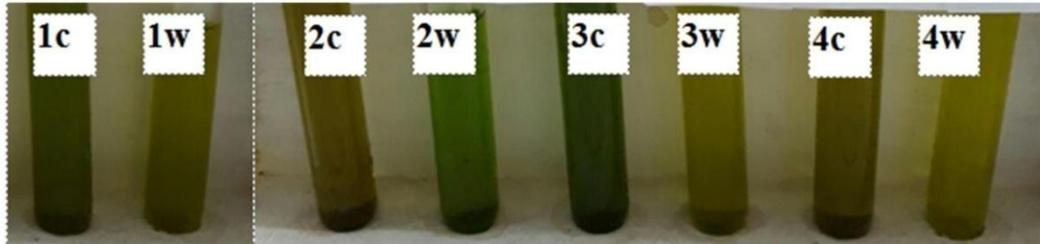
Keterangan :

5. Varietas manilo                      c : kontrol
6. Varietas jinten                        f: perlakuan flooding
7. Varietas jepon emas
8. Varietas P951



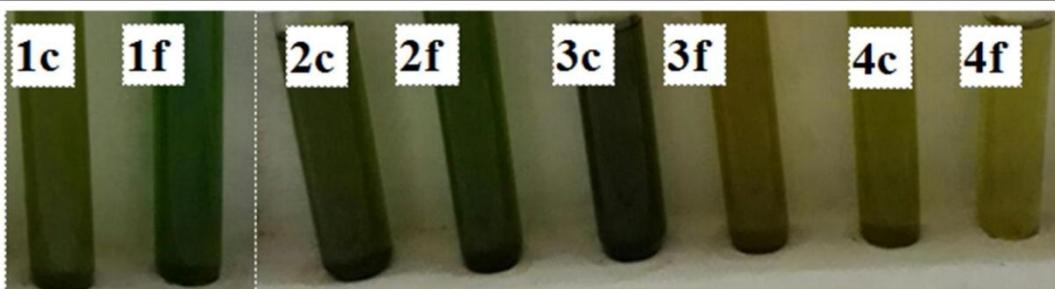
## Lampiran 5

### Hasil pengukuran kadar klorofil



Keterangan :

1. Varietas manilo                      c : kontrol
2. Varietas jinten                        w: perlakuan waterlogging
3. Varietas jepon emas
4. Varietas P951



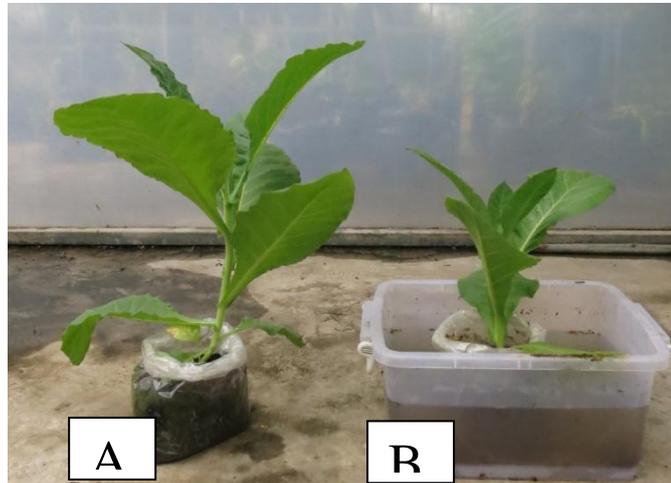
Keterangan :

1. Varietas manilo                      c : kontrol
2. Varietas jinten                        f: perlakuan flooding
3. Varietas jepon emas
4. Varietas P951



## Lampiran 6

### Perlakuan Waterlogging



Keterangan : (A)Tanaman tembakau Kontrol, (B) Tanaman Tembakau Perlakuan

### Perlakuan Flooding



Perlakuan flooding dan pengontrolan tinggi setiap hari.

