



TUGAS AKHIR - SB141510

PENGARUH PRA-PERLAKUAN PARAQUAT TERHADAP
KANDUNGAN SENYAWA ANTIOKSIDAN PADA
TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L.)
var.MKY PADA KONDISI TERCEKAM KEKERINGAN

MUHAMMAD ICHSAN AL FARISY
1513100066

Dosen Pembimbing
Dr. Nurul Jadid, M.Sc.

DEPARTEMEN BIOLOGI
Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2018



TUGAS AKHIR - SB141510

**PENGARUH PRA-PERLAKUAN PARAQUAT TERHADAP
KANDUNGAN SENYAWA ANTIOKSIDAN PADA
TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L.)
var.MKY PADA KONDISI TERCEKAM KEKERINGAN**

**MUHAMMAD ICHSAN AL FARISY
1513100066**

**Dosen Pembimbing
Dr. Nurul Jadid, M.Sc.**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2018**



FINAL PROJECT - SB141510

**THE EFFECT OF PARAQUAT PRETREATMENT TO
ANTIOXIDANT CONTENT IN TOBACCO (*Nicotiana
tabacum* L.) var MKY IN DROUGHT STRESS
CONDITION**

**MUHAMMAD ICHSAN AL FARISY
1513100066**

**Dosen Pembimbing
Dr. Nurul Jadid, M.Sc.**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2018**

LEMBAR PENGESAHAN

LAPORAN TUGAS AKHIR

PENGARUH PRA-PERLAKUAN PARAQUAT TERHADAP
KANDUNGAN SENYAWA ANTIOKSIDAN PADA
TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L.) var.MKY
PADA KONDISI TERCEKAM KEKERINGAN

Oleh :

MUHAMMAD ICHSAN AL FARISY
NRP. 1513 100 066

Surabaya, 26 Januari 2018

Menyetujui :

Dosen Pembimbing Departemen

Dr. Nurul Jadid, M.Sc.

NIP. 19820512 200501 1 002

Mengetahui

Dekan Fakultas Biologi Departemen Biologi ITS



Hidayati, S.Si, M.Si

NIP. 19690721 199802 2 001

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas berkat dan karunianya yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Tugas Akhir dengan judul “Pengaruh pra-perlakuan Paraquat terhadap kandungan senyawa antioksidan pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Var.MKY pada kondisi tercekam kekeringan”, sebagai salah satu syarat kelulusan Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Dalam melakukan studi literatur penelitian dan penyusunan laporan penulis tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih kepada pembimbing, Dr. Nurul Jadid, M.Sc. yang senantiasa mendampingi dan memberikan banyak sekali ilmu, waktu, serta nasihat. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada kedua orang tua atas restu dan doa yang diberikan. Tak lupa saya ucapkan terimakasih kepada Bapak ibu dosen, karyawan, sahabat, teman, senior, dan adek tingkat yang tidak mungkin saya sebutkan namanya satu persatu.

Surabaya,

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
Abstrak	xii
<i>Abstract</i>	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	3
1.3 Batasan masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tanaman Tembakau	5
2.2 Klasifikasi Taksonomi.....	6
2.3 Varietas MKY	6
2.4 Paraquat.....	7
2.5 Cekaman kekeringan	8
2.6 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS).....	11
2.7 Respon terhadap ROS	14
2.8 Malondialdehid (MDA).....	17

2.9 Karotenoid.....	18
2.10 Klorofil.....	20
BAB III METODOLOGI	23
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Tugas Akhir	23
3.2 Bahan dan Metode.....	23
3.2.1 Pembibitan.....	23
3.2.2 Perlakuan sebelum pemberian cekaman	23
3.2.3 Perlakuan setelah pemberian cekaman	24
3.2.4 Penentuan kadar Malonaldehyde (MDA)	24
3.2.5 Penentuan kadar klorofil.....	25
3.2.6 Penentuan kandungan Asam askorbat	25
3.2.7 Penentuan kandungan air relatif	25
3.2.8 Statistik.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Kandungan Asam Askorbat.....	27
4.2 Kandungan Air Relatif	33
4.3 Kandungan Klorofil Daun	36
4.4 Kandungan Malondialdehyde	39
BAB V KESIMPULAN	45
DAFTAR PUSTAKA.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Morfologi tembakau secara umum.....	5
Gambar 2.2	Morfologi tembakau var. MKY	6
Gambar 2.3	Struktur kimia paraquat	8
Gambar 2.4	Alur metabolisme ROS	12
Gambar 2.5	Ringkasan sistem enzim	13
Gambar 2.6	Metabolisme sistem redoks AsA	15
Gambar 2.7	Siklus askorbat-glutathione	17
Gambar 2.8	Struktur kimia malondialdehid.....	17
Gambar 2.9	Struktur molekul karotenoid	19
Gambar 2.10	Struktur molekul klorofil	21
Gambar 4.1	Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap AsA.....	28
Gambar 4.2	Respon tanaman terhadap pra-perlakuan paraquat	30
Gambar 4.3	Siklus askorbat glutathione	31
Gambar 4.4	Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap KAR.....	33
Gambar 4.5	Perbandingan morfologi tiap perlakuan	35
Gambar 4.6	Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap klorofil	36
Gambar 4.7	Regenerasi H ₂ O ₂	38
Gambar 4.8	Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap MDA	40
Gambar 4.9	Daun tembakau pasca pemberian pra-perlakuan dengan paraquat	41
Gambar 4.10	Proses peroksidasi lipid	42

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap AsA28

Tabel 4.2 Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap KAR34

Tabel 4.3 Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap klorofil . 37

Tabel 4.4 Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap MDA ... 40

PENGARUH PRA-PERLAKUAN PARAQUAT TERHADAP
KANDUNGAN SENYAWA ANTIOKSIDAN PADA
TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum L.*) var.MKY
YANG TERCEKAM KEKERINGAN

Nama Mahasiswa : **Muhammad Ichsan Al Farisy**
NRP : **1513100066**
Departemen : **Biologi**
Dosen Pembimbing : **Dr. Nurul Jadid, M.Sc**

Abstrak

Kekeringan merupakan faktor utama yang membatasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman serta berpengaruh terhadap produktivitas tanaman di seluruh dunia, utamanya di daerah tropis. Salah satu bentuk pertahanan tanaman yaitu dengan melakukan mekanisme produksi antioksidan berupa asam askorbat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh (PQ) paraquat terhadap kandungan asam askorbat, klorofil, kandungan air relatif dan malondialdehid pada tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) var. MKY yang dicekam kekeringan. Cekaman kekeringan dilakukan dengan cara melakukan penghentian pemberian air pada tanaman, serta digunakan PQ dengan konsentrasi 0.0005, 0.001, 0.0025, dan 0.005%. Parameter yang diukur adalah kandungan Malondialdehyde (MDA), asam askorbat (AsA), klorofil, dan kandungan air relatif. Pemberian pra-perlakuan menggunakan paraquat dengan konsentrasi tersebut terbukti mampu meningkatkan kandungan senyawa antioksidan berupa asam askorbat, kandungan klorofil, kandungan air relatif, namun tidak berpengaruh signifikan terhadap kandungan malondialdehid. Paraquat dengan konsentrasi 0.001% dinilai merupakan konsentrasi yang paling optimal sebagai *second messenger* untuk meningkatkan respon *N. tabacum* dibawah cekaman kekeringan .

Kata kunci: Antioksidan, MDA, Paraquat, ROS, *N.tabacum* var MKY

THE EFFECT OF PARAQUAT PRETREATMENT TO ANTIOXIDANT CONTENT IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) Var MKY IN DROUGHT STRESS

Nama Mahasiswa : Muhammad Ichsan AlFarisy
NRP : 1513100066
Departemen : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Nurul Jadid, M.Sc

Abstract

*Drought is the major factor that limit the plant growth and development also effected to plant productivity in the world, especially in the tropical country. Like other plants, tobacco also develop a defense mechanism to response drought stress. One of the response mechanism is producing an antioxidant such as ascorbic acid. The airm of this research in to understand the effect of PQ to ascorbic acid, chlorophyll, relative water, and malondialdehyde content on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) var. MKY in drought stress. Drought stress given by stopping the water treatment, and give paraquat (PQ) with low concentration (0.0005, 0.001, 0.0025, dan 0.005%). The measured parameter is Malondialdehyde content (MDA), ascorbic acid (T-AsA), chlorophyll, and relative water content. Based on these, the research about the antioxidant enhancement in the drought condition is needs. Pretreatment with this consenstration proved be able to increase the antioxidant content such as ascorbic acid, chlorophyll content, relative water content, but no significant effect on malondialdehyde. Pretreath paraquat with 0.001% is the most optimum concentration as a second messenger to increase *N. tabacum* response in drought stress condition.*

*Key word: Antioxidant, MDA, Paraquat, ROS, Signaling, *N. tabacum* var MKY*

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Cekaman lingkungan merupakan salah satu faktor eksternal yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Taiz *et al.*, 1991). Seperti halnya tanaman lain, produktivitas tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) juga dipengaruhi oleh cekaman biotik dan abiotik. Faktor biotik meliputi serangan serangga, jamur dan mikrobia (Abiri *et al.*, 2017). Sedangkan faktor cekaman abiotik meliputi kekeringan, suhu ekstrim, cekaman genangan, salinitas (Aysin, 2015). Diantara faktor abiotik tersebut, kekeringan merupakan faktor utama yang membatasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman serta berpengaruh terhadap produktivitas tanaman di seluruh dunia, utamanya di daerah tropis (Nosławicz, 2016).

Tembakau (*N. tabacum* L.) merupakan salah satu spesies dalam famili Solanaceae yang bernilai ekonomi tinggi (Rachmat *et al.*, 2010). Tanaman tersebut merupakan tanaman non-pangan asli Amerika yang banyak dibudidayakan di hampir seluruh dunia (Darvishzadeh *et al.*, 2013). Sejauh ini, daun tembakau diproses secara komersial sebagai bahan utama rokok dan cerutu (Denduangboripant *et al.*, 2010). Namun demikian, tembakau juga memiliki potensi untuk dikembangkan dalam industri kosmetik (Ru *et al.*, 2012), bioenergi (Martinez *et al.*, 2017), biopestisida dan industri farmasi (Davalieva, 2010). Selain itu, tanaman tersebut juga digunakan sebagai salah satu sistem model yang paling penting dalam pengembangan bioteknologi tanaman (Davalieva *et al.*, 2010).

Di Indonesia terdapat banyak varietas tembakau yang telah dibudidayakan oleh petani. Beberapa varietas tersebut antara lain adalah Prancak 95, Marakot, Jepon Mawar, dan MKY. Masing-masing varietas tersebut memiliki karakteristik yang khas, baik karakter morfologi, fisiologi dan fitokimia (PT SADHANA, 2016). Seperti halnya tanaman yang lain, tembakau juga memiliki mekanisme respon terhadap cekaman kekeringan.

Respon tersebut meliputi respon morfo-anatomi, fisiologi, molekuler dan biokimia (Shuai *et al.*, 2011; Yui *et al.*, 2011). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa cekaman kekeringan dapat menghambat pertumbuhan akar (Ai *et al.*, 2013), daun, batang (Sun *et al.*, 2013) dan menginduksi penutupan stomata (Esmailpour, 2016). Selain itu Hyskova (2014) juga menyebutkan bahwa cekaman kekeringan berdampak pada menurunnya laju fotosintesis. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Estiasih (2012), cekaman kekeringan juga berdampak pada perubahan ekspresi dari beberapa gen responsif terhadap cekaman kekeringan, diantaranya *NtABA2*, *NtERD10B* dan *NtLTPI* pada tiga varietas (Marakot, Jepon Mawar dan MKY), varietas MKY memiliki respon yang paling baik diantara ketiga varietas yang lain terhadap cekaman kekeringan.

Selain itu, salah satu bentuk umum respon tanaman terhadap cekaman kekeringan adalah diproduksinya ROS (*Reactive Oxygen Species*) dalam jumlah berlebih (Nxele, 2017). ROS yang terbentuk dapat menyebabkan deformasi membran sel sebagai akibat stres oksidatif pada membran lipid dan *apparatus* fotosintesis, merusak biomolekul lain seperti protein dan DNA hingga menyebabkan mutasi (Sgherri, 1995). Beberapa contoh jenis ROS yang sangat reaktif adalah singlet oksigen ($^1\text{O}_2$), hydrogen peroksida (H_2O_2), superoksida (O_2^-) dan radikal hidroksil ($^{\bullet}\text{OH}$). Selain memberi dampak negatif, pada konsentrasi yang rendah, ROS juga berfungsi sebagai *second messenger* dalam sistem transduksi sinyal respon tanaman terhadap cekaman lingkungan (Liu, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2009) membuktikan bahwa pra perlakuan menggunakan Paraquat (PQ) mampu meningkatkan enzim antioksidan dan melindungi sel-sel dari kerusakan oleh ROS pada tanaman mentimun (*Cucumis sativus*) dibawah cekaman kekeringan. Pra perlakuan tersebut dapat digunakan sebagai alternatif dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan. PQ adalah herbisida yang memiliki komponen aktif berupa metil viologen (MV; 1,1'-

dimetil-4,4'-bipyridinium diklorida), memberi efek *phytotoxic* pada tanaman dengan mentransfer elektron dari fotosistem I ke molekul oksigen, mengakibatkan akumulasi radikal superoksida di kloroplas (Lascano, 2012). Hingga saat ini, penelitian tentang pengaruh PQ terhadap kandungan senyawa antioksidan pada tanaman tembakau varietas yang banyak dikembangkan di Indonesia masih jarang dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian PQ terhadap peroksidasi lipid, sintesis senyawa antioksidan pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Var.MKY yang tercekam kekeringan.

1.2 Permasalahan

Permasalahan dalam penelitian ini yaitu bagaimana pengaruh PQ terhadap kandungan asam askorbat, klorofil, kandungan air relatif dan malondialdehid pada tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) var. MKY yang dicekam kekeringan.

1.3 Batasan masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Tembakau var. MKY yang diperoleh dari PT. Sadhana
2. Pemberian perlakuan cekaman kekeringan dilakukan secara *in vivo*
3. Senyawa antioksidan yang dianalisa antara lain adalah asam askorbat

1.4 Tujuan

Peneitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh PQ terhadap kandungan asam askorbat, klorofil, kandungan air relatif dan malondialdehid pada tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) var. MKY yang dicekam kekeringan.

1.5 Manfaat

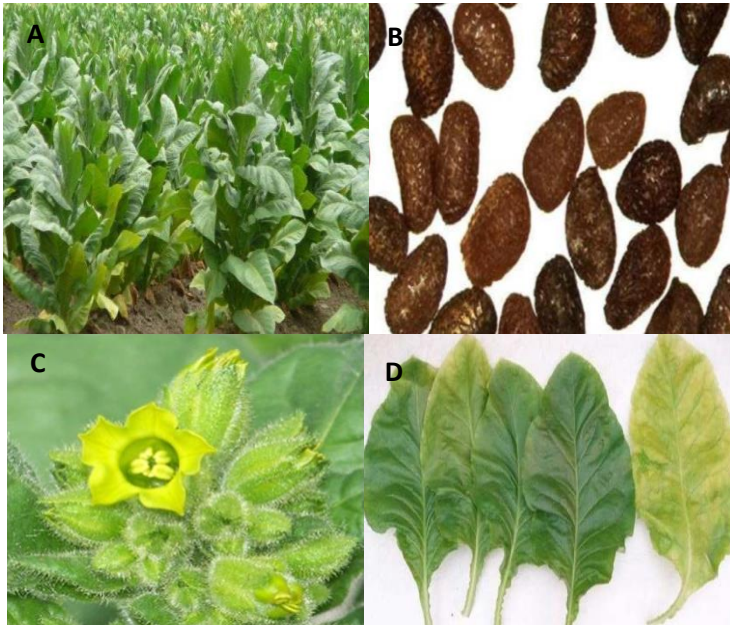
Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan alternatif metodologi dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan pada tanaman tembakau.

“Halaman ini sengaja di kosongkan”

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Tembakau

Nicotiana tabacum merupakan tanaman asli Amerika yang sekarang dibudidayakan secara komersial di seluruh dunia. *Nicotiana tabacum* adalah tanaman tahunan yang mampu tumbuh hingga tinggi 1- 2 meter , dengan daun hijau besar, lonjong-lanset, bunga berwarna putih-merah muda, merah atau kemerahan, dengan panjang bunga 4 -5 cm (Kishore, 2014)



Gambar 2. 1 (A) Tanaman tembakau , (B) Biji , (C) Bunga, dan (D) Daun tembakau

2.2 Klasifikasi Taksonomi

Tembakau memiliki klasifikasi taksonomi sebagai berikut :

- Kingdom : Plantae
- Division : Magnoliophyta
- Class : Magnoliopsida
- Order : Solanales
- Family : Solanaceae
- Genus : *Nicotiana*
- Species : *Nicotiana tabacum var MKY*

(Kishore, 2014)

2.3 Varietas MKY

Varietas MKY memiliki habitus silindris dan tinggi 207,0 cm (180,3cm – 233,7cm).batang berwarna hijau dan berbulu, berdiameter 2,72 cm (2,19cm-3,25cm). daun berjumlah sedang yaitu 25 lembar (20-30 lembar), panjangnya 57,2 cm (51,0cm – 63,3 cm), lebarnya 32,3 cm (26,1cm – 39,6 cm) berbentuk oval, tepi berombak, permukaan daun berploi, bentuk bunga *italic inverted conical* (PT.Sadhana, 2016)

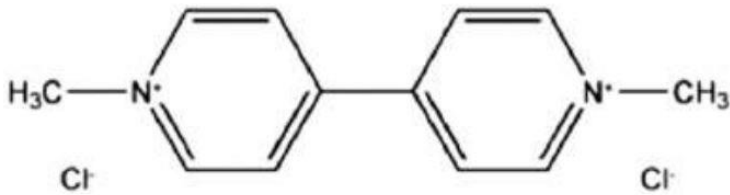


Gambar 2.2 Morfologi tembakau Varietas MKY (Sadhana, 2016)

2.4 Paraquat

Herbisida paraquat termasuk kelompok herbisida Bipyridylum, yaitu memiliki dua cincin *pyridyl*. Kelompok herbisida ini dapat merusak jaringan tanaman dengan cepat, yang mengakibatkan tanaman kelihatan terbakar yang mengarah kepada kerusakan membran sel. Herbisida ini termasuk senyawa bermuatan positif, yang akan direduksi oleh fotosintesis untuk membentuk radikal bebas yang relatif tidak stabil. Radikal bebas ini mudah dioksidasi dengan adanya oksigen untuk membentuk kembali ion aslinya dan hidrogen peroksida, yang akan merusak jaringan tanaman. Pada tingkat selular akan menyebabkan pecahnya membran sel dan kloroplas (Chia *et al.*, 1982). Paraquat diaplikasikan melalui daun dan tidak bisa lewat akar, karena struktur kimia paraquat yang bermuatan positif cenderung untuk berikatan dengan tanah yang bermuatan negatif (Mckersie & Leshem, 1994).

Herbisida paraquat merupakan herbisida yang memiliki ikatan elektrolit yang kuat. Paraquat bekerja secara kontak non-selektif dengan cara merebut elektron pada rantai transpor elektron fotosintesis PS I. Pada keadaan ini paraquat menjadi tidak stabil sehingga berusaha untuk melepaskan elektron tersebut. Reaksi ini menghasilkan radikal *bipyridyl* yang akan bereaksi dengan oksigen membentuk superoksida, proses selanjutnya akan terbentuk hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. ROS ini akan menginduksi terjadinya peroksidasi lipid, penurunan laju fotosintesis, dan kehilangan integritas membran (Chia *et al.*, 1982). Struktur kimia paraquat ditunjukkan pada gambar 2.3.



(Watts, 2011)

Gambar 2.3 Struktur kimia paraquat, 1,1'-dimethyl- 4,4'-bipyridilium ion (diklorid)

Kerusakan membran ini terjadi karena reaksi antara radikal bebas yang sangat reaktif berikatan dengan asam lemak pada membran. Asam lemak merupakan bagian dari fosfolipid, komponen utama penyusun membran. Pada bagian ekor fosfolipid ini terdapat ikatan ganda yang akan cenderung diikat oleh molekul reaktif tersebut. Ikatan ini mengakibatkan asam lemak yang semula tidak jenuh, menjadi jenuh. Hal ini akan merubah struktur membran dan menurunkan permeabilitas membran, pada tahap selanjutnya dapat mengakibatkan kebocoran pada membran (Chia *et al.*, 1982). Perlakuan dengan paraquat dapat menurunkan kandungan klorofil dan protein daun sehingga terjadi peningkatan penghambatan fotosintesis tanaman. Perlakuan paraquat tidak mempengaruhi aktivitas rubisko tapi dapat meningkatkan laju fotorespirasi (Popova *et al.*, 2003). Gejala kerusakan akibat perlakuan paraquat dapat menimbulkan nekrosis pada daun dan juga menimbulkan bintik-bintik pada jaringan daun.

2.5 Cekaman kekeringan

Air memiliki peranan yang sangat penting dalam kehidupan tanaman. Setiap tanaman harus dapat menyeimbangkan antara proses kehilangan air dan proses penyerapannya, bila proses kehilangan air tidak diimbangi dengan penyerapan melalui akar maka akan terjadi kekurangan air didalam sel tanaman yang dapat

menyebabkan berbagai kerusakan pada banyak proses dalam sel tanaman (Taiz *et al.*, 2002)

Menurut Adisaranto (2005) jumlah air yang dibutuhkan tanaman untuk pertumbuhannya berbeda-beda pada tiap jenis tanaman. Pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) jumlah air yang dibutuhkan selama hidupnya sebesar 300 – 650 mm, bila kebutuhan air tidak terpenuhi maka proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman akan terganggu.

Cekaman lingkungan merupakan tantangan utama dalam memproduksi tanaman secara berkelanjutan. Dalam menghadapi kondisi stress lingkungan, tanaman memberikan respon secara fisiologi dan biokimia, sebagai upaya untuk menerima, menghindari dan menetralkan pengaruh dari cekaman. Sifat peka dan toleran suatu tanaman bergantung kepada sifat genetik dan respon biokimia yang dimiliki suatu spesies, sehingga selama bertahun-tahun para peneliti memfokuskan diri untuk membangun kemampuan tanaman secara genetik dan biokimia menghadapi berbagai kondisi cekaman lingkungan (Dubey, 1995)

Cekaman kekeringan merupakan pengaruh faktor lingkungan yang menyebabkan air tidak tersedia bagi tanaman, yang dapat disebabkan antara lain oleh tidak tersedianya air di daerah perakaran tanaman dan kebutuhan air yang besar di daerah daun dimana laju evaporasi melebihi laju absorpsi air oleh akar tanaman (Hamim, 2004).

Ketika jumlah absorpsi air mulai terbatas, maka tanaman memiliki mekanisme untuk mencegah kehilangan air dengan melakukan penutupan stomata. Perubahan pada ketahanan mekanisme stomata sangat diperlukan untuk mengatur kehilangan air oleh tanaman dan untuk mengatur pengambilan karbondioksida (CO₂) yang penting untuk ketersediaan fiksasi CO₂ selama proses fotosintesis (Taiz, 2002).

Relatif Water Content (RWC) yang menggambarkan kadar relatif air daun merupakan parameter ketahanan tanaman menghadapi cekaman kekeringan. Proses fotosintesis pada sebagian besar tanaman akan mulai tertekan bila nilai RWC

tanaman lebih rendah dari 70 persen, sehingga tanaman memerlukan pengaturan dalam tubuhnya diantaranya dengan melakukan penutupan stomata (Quilambo, 2004)

Mekanisme penutupan stomata dipengaruhi oleh ABA juga dipengaruhi oleh adanya penurunan konduktansi hidrolik daun (*leaf hydraulic conductance*) sehingga terjadi pengurangan tekanan turgor daun sebagai upaya penyelamatan proses fotosintesis agar tetap dapat berjalan (Brobrib, 2003)

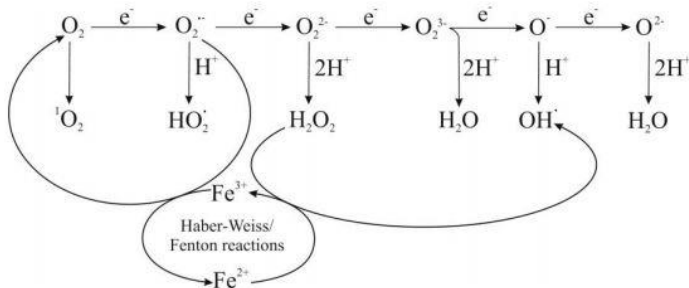
Tanaman memiliki reaksi yang sangat kompleks menghadapi cekaman kekeringan. Bentuk morfologi, anatomi dan metabolisme tanaman yang berbeda menyebabkan tanaman memiliki respon yang beragam. Ketika kekeringan semakin meningkat maka tanaman menyesuaikan diri melalui proses fisiologi yang kemudian diikuti perubahan struktur morfologi tanaman seperti layu, meningkatkan pertumbuhan akar dan menghambat pertumbuhan pucuk, Penurunan pertumbuhan vegetative menyebabkan penurunan produksi seperti berkurangnya hasil panen secara kualitas maupun kuantitas (Taiz *et al.*, 2002).

Pada kondisi tercekam, tanaman tidak dapat mengekspresikan potensial genetiknya secara penuh. Berbagai kondisi cekaman lingkungan menyebabkan perubahan penting pada ekspresi gen tanaman, terjadinya peningkatan akumulasi ion anorganik, terjadinya peningkatan akumulasi ion anorganik, terjadinya perubahan pada sintesis protein dengan mengeluarkan protein baru yang spesifik pada kondisi cekaman tertentu, serta perilaku berbagai macam enzim (Patakas *et al.*, 2002)

2.6 Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan radikal bebas yang sangat berbahaya bagi makhluk hidup. Pada tanaman ROS terbentuk dalam sel melalui beberapa cara yaitu : 1. Produksi fotokimia ke atmosfer akibat pencemaran udara, 2. Penyumbangan elektron langsung ke oksigen ketika terjadi fotosintesis terutama pada kondisi cahaya yang tinggi dan konsentrasi CO₂ pada kloroplas yang rendah. 3. Respon terhadap kondisi cekaman seperti kekeringan, suhu tinggi, salinitas, ozon dan serangan mikroba (Pritchard *et al.*, 1996).

ROS yang terbentuk akan berbahaya bagi sel tanaman karena dapat mengoksidasi membrane lipid dan apparatus fotosintesis . Melalui berbagai reaksi metabolisme tanaman, oksigen dapat diubah menjadi bentuk molekul yang sangat reaktif seperti singlet oksigen (¹O₂), hydrogen peroksida (H₂O₂), superoksida (O₂⁻) dan radikal hidroksil ([•]OH). Superoksida dapat berubah bentuk menjadi hydrogen peroksida (H₂O₂), radikal ini dapat menyebabkan kerusakan melalui beberapa cara yaitu memutus ikatan rantai protein, merusak membrane lemak dan bereaksi dengan DNA sehingga menyebabkan mutasi sel (Sgherri *et al* , 1995). Alur metabolik ROS ditunjukkan pada gambar 2.4.

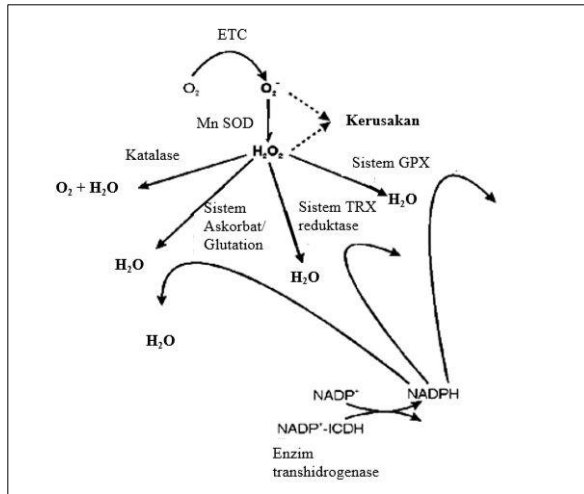


Gambar 2.4 Alur metabolik dalam pengurangan univalen dari molekul oksigen (O₂) ke air (H₂O) yang mengarah ke generasi berbagai spesies oksigen reaktif intermediet (ROS) pada tanaman (Halliwell, 2000)

Terbentuknya H_2O_2 di kloroplas terjadi karena terhambatnya proses fotosintesis menyebabkan tanaman kelebihan energy elektron yang ditangkap oleh pusat reaksi tidak dapat dilepas atau dipantulkan secara aman sehingga merusak perangkat fotosistem II pada kloroplas dan membran lipid (Kader,1996)

Prochazkova *et al* (2001) menerangkan bahwa cekaman kekeringan diketahui dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada tanaman dengan menginduksi pembentukan senyawa ROS. Hal ini karena tanaman yang terkena cekaman kekeringan akan menginduksi ABA sehingga terjadi penutupan stomata untuk mengurangi laju transpirasi. Stomata yang tertutup menyebabkan rendahnya kandungan CO_2 pada kloroplas tidak dapat melepaskan energy yang diperoleh dari proses fotosintesis secara aman sehingga terbentuklah superoxide anion (O_2^-) yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada organel fotosintesis.

Sebagai upaya untuk mengurangi dampak kerusakan sel akibat cekaman oksidatif maka tanaman membentuk enzim senyawa antioksidan (lihat Gambar 1) yang dapat mengkatalisis reaksi untuk mengurangi tingkat detoksifikasi ROS secara langsung maupun tidak langsung di dalam sel tanaman (Pritchard *et al.*,2000). Sistem enzim ditunjukkan pada gambar 2.5.



Gambar 2.5 Ringkasan sistem enzim dapat bekerja dalam menetralkan racun ROS pada mitokondria tanaman. Ke ETC: *electron transport chain*, IDHC: *isocitrate dehydrogenase*, MnSOD: Mn-superoksida dismutase: Trx: thioredoxin (Pritchard *et al.* 2000)

Sistem antioksidan didalam sel tumbuhan menyediakan perlindungan melawan pengaruh racun dari oksigen spesies yang aktif. Komponen penting dari sistem perlindungan itu adalah pertahanan secara enzimatis, seperti SOD dan katalase yang dapat menghindari O_2^- dan H_2O_2 selain metabolit seperti askorbat, glutatoin dan tokoperol yang berfungsi untuk mengatur tingkat keaktifan oksigen pada jaringan tanaman (Bosch *et al.*, 2002)

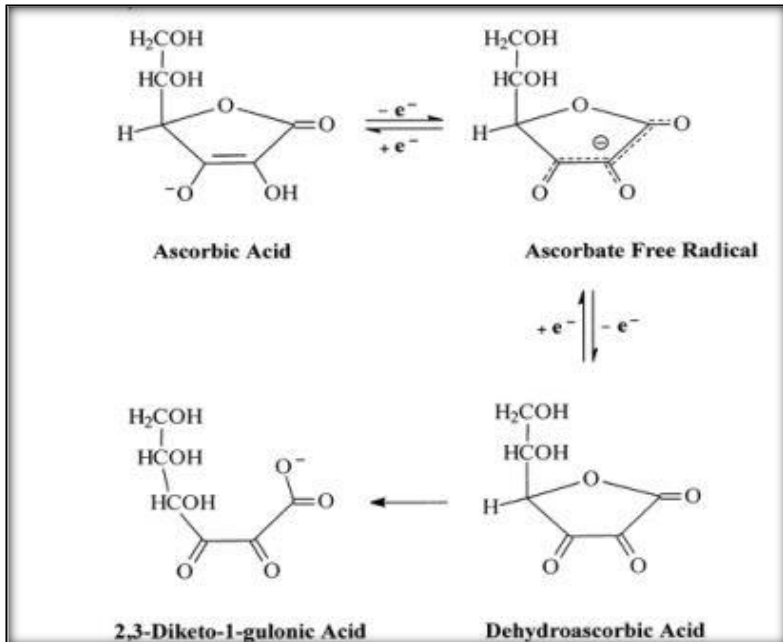
Untuk melindungi apparatus fotosintesis dari kerusakan oksidatif, tanaman harus melepaskan kelebihan energy cahaya yang diterima. Perlindungan dapat terjadi dengan penurunan efisiensi fotokimia lewat siklus xanthophyll atau dengan pengaturan aliran electron yang melibatkan lintasan alternative seperti fotorespirasi dan reaksi peroksidasi mehler. Lintasan fotorespirasi dan siklus xanthophyll dapat menyebabkan

peningkatan jumlah produksi spesies oksigen yang dapat meracuni tanaman berupa O_2^- dan H_2O_2 (Bosch *et al.*, 2002).

2.7 Respon terhadap ROS

Selama proses fotosintesis ROS dibentuk dan dirombak kembali. Pembentukan ROS akan meningkat ketika kondisi lingkungan tidak menguntungkan terus terjadi, namun tanaman mempunyai suatu mekanisme penyelamatan terhadap kondisi tersebut. Mekanisme penyelamatan ini antara lain melalui mekanisme antioksidan baik yang bersifat enzimatik maupun nonenzimatik untuk menghindari kerusakan yang terjadi akibat stres oksidatif. Mekanisme non-enzimatik antioksidasi meliputi senyawa-senyawa antioksidan seperti: asam askorbat (AsA), glutathion (GSH), termasuk juga tocopherol, flavonoid, alkaloid dan karotenoid (Apel and Hirt 2004).

AsA atau vitamin C merupakan asam organik dengan kemampuan antioksidan. AsA dapat larut dalam air dan sangat mudah dioksidasi yaitu sebagai senyawa reduktan. AsA akan rusak ketika ditempatkan pada cahaya atau panas yang akan berubah dalam bentuk teroksidasi yaitu asam dehidroaskorbat (Tiez ,2006). Metabolisme redoks Asam askorbat ditunjukkan pada gambar 2.6.

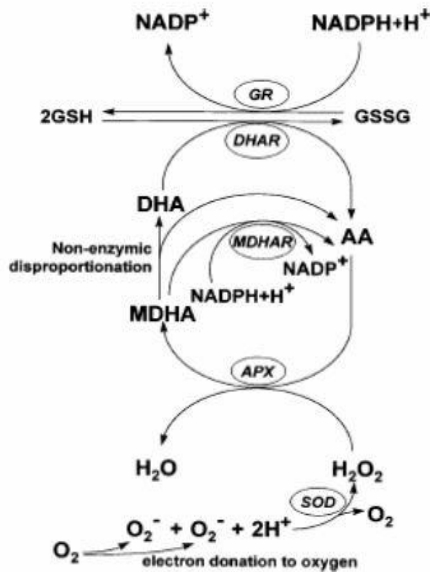


Gambar 2.6 Metabolisme redoks asam askorbat .

Askorbat memenuhi banyak fungsi penting pada biologi tanaman (Noctor and Foyer 1998). Askorbat juga digunakan sebagai ko-faktor untuk *violaxanthin de-epoxidase* pada siklus

xanthophyll. Proses ini dilibatkan dalam perlindungan pelepasan penyerapan cahaya dalam bentuk panas dan bisa diukur sebagai NPQ dari klorofil fluorescence (Sonja *et al.*, 2002). ASA sebagai senyawa antioksidan dapat berinteraksi dengan membran plasma dan mendonorkan elektronnya ke radikal -tocopheroxyl dan aktivitas trans-membran plasma oksidoreduktase. Recycling tocopheroxyl dapat membantu melindungi membran plasma dari peroksidasi (May,1999). Mekanisme penyelamatan secara enzimatik melibatkan enzim antioksidan antara lain yaitu: superoksida dismutase (SOD); askorbat peroksidase (APX); monodehidroaskorbat reduktase (MDHAR); dehidroaskorbat reduktase (DHAR); glutation reduktase (GR); katalase (CAT) dan glutation peroksidase (GPX), sebagai akibat dari peningkatan radikal bebas di kloroplas (Aroca, 2000; Borsani *et al.* 2001; Huang, 2001; Foyer, 1998; Sonja *et al.*, 2001).

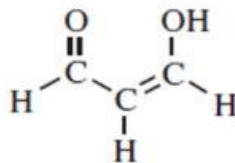
Enzim antioksidan seperti SOD, dibutuhkan untuk merubah superoksida menjadi bentuk radikal oksigen (O^2) dan H_2O_2 . Hidrogen peroksida ini merupakan oksidan kuat yang dapat mengganggu proses fotosintesis di kloroplas. Keberadaan enzim CAT dapat merubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen Reduksi H_2O_2 ini membutuhkan senyawa reduktan yaitu ASA. Enzim APX dengan 2 molekul ASA akan mereduksi H_2O_2 menjadi air dan membentuk MDHA. MDHA memiliki elektron bebas sehingga harus segera direduksi menjadi ASA atau dehidroaskorbat (DHA). DHA reduktase selanjutnya akan mereduksi DHA menjadi ASA. Pada reaksi ini digunakan glutation (GSH) sebagai substrat dan membentuk glutation disulphida (GSSG). GSSG dapat kembali membentuk GSH oleh NADPH yang dikatalisis oleh GR (Noctor and Foyer 1998). Siklus Askorbat Glutation ditunjukkan pada gambar 2.7.



Gambar 2.7 Siklus askorbat-glutation (Noctor and Foyer 1998)

2.8 Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid adalah senyawa organik dengan rumus umum $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, spesies reaktif ini terjadi secara alami dan merupakan penanda untuk stres oksidatif. Struktur kimia MDA ditunjukkan pada gambar 2.8.



Gambar 2.8 Struktur kimia Malondialdehyde (Sochr, 2014)

Malondialdehyde dihasilkan dari peroksidasi lipid asam lemak tak jenuh ganda (Davey *et al.*, 2005). Tingkat peroksidasi lipid dapat diperkirakan dengan jumlah MDA dalam jaringan (Davey *et al.*, 2005). Senyawa ini merupakan aldehida reaktif dan merupakan salah satu dari banyak spesies elektrofil reaktif yang menyebabkan stres beracun dalam sel. Produksi aldehida ini digunakan sebagai biomarker untuk mengukur tingkat stres oksidatif dalam suatu organisme (Rio *et al.*, 2005).

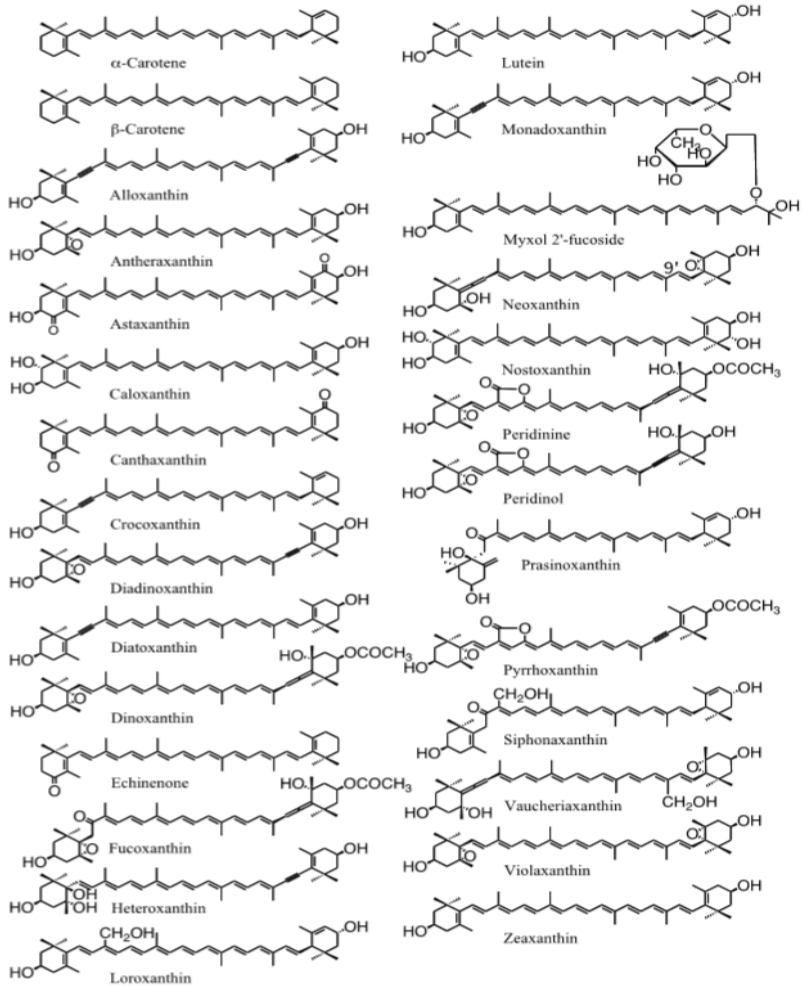
2.9 Karotenoid

Karotenoid adalah pigmen tanaman dengan 40 atom karbon per molekul (tetraterpenoids) (Britton *et al.*, 2008). Karotenoid yang berikatan dengan oksigen dikenal dengan sebutan xanthophylls, sedangkan yang tidak berikatan dengan oksigen dikenal dengan karoten. Pada tumbuhan, karotenoid bertindak sebagai pigmen tambahan saat fotosintesis dan juga berfungsi untuk melindungi tanaman dari radikal bebas yang dilepaskan dari chloroplast selama fotosintesis (Miller, 2010). Karotenoid juga melindungi tanaman dari foto-oksidatif perusak melalui disipasi suhu (siklus xanthophyll). Proses ini terjadi ketika ekseseif cahaya meningkatkan pH tilakoid, yang mana aktivitas enzim violaxanthin epoxidase (VDE), mengkonversi violaxanthin menjadi zeaxanthin. Molekul zeaxanthin dan foton mengubah konformasi di light harvesting complexes (LHC), membantu disipasi suhu (Stange *et al.*, 2012)

Karotenoid yang umumnya ditemukan pada alga coklat adalah B-karoten, yakni karotenoid yang tidak memiliki atom oksigen dalam strukturnya (Biranti *et al.*, 2009). Golongan senyawa karoten sudah dikenal memiliki aktivitas antitumor yang baik (Clevidence *et al.*, 1997). Pada proses fotosintesis, karotenoid dan klorofil keduanya dibutuhkan oleh rantai peptide untuk membentuk pigmen protein kompleks pada membrane tilakoid (Neilson, 2010).

Lebih dari 750 struktur karotenoid ditemukan di alam yaitu pada tumbuhan darat, algae, bakteri termasuk cyanobacteria

dan bakteri fotosintesis, archaea, jamur dan hewan (Britton et al., 2004). Berbagai jenis karotenoid yang ditemukan dari spesies algae telah dipelajari. Struktur beberapa karotenoid penting diilustrasikan pada gambar dibawah:



Gambar 2.9 Struktur beberapa jenis karotenoid

Diantara struktur tersebut, sekitar 30 jenis mungkin memiliki fungsi dalam fotosintesis, dan lainnya berfungsi untuk akumulasi karotenoid atau karotenogenesis. Beberapa karotenoid hanya ditemukan di beberapa divisi atau kelas algae, karena itu, karotenoid dan klorofil juga dapat digunakan sebagai penanda kemotaksonomi (Rowan, 1989)

Karotenoid telah banyak ditemukan pada alga. Fucoxanthin ditemukan pada algae coklat dan diatom. 10'-acyloxyfucoxanthin ditemukan pada Haptophyta dan Dinophyta. Peridinin hanya ditemukan pada dinoflagellata. Alloxanthin, crocoxanthin dan monadoxanthin ditemukan pada Cryptophyta. Diadinoxanthin dan diatoxanthin ditemukan pada Heterokontophyta, Haptophyta, Dinophyta dan Euglenophyta (Takaichi, 2011).

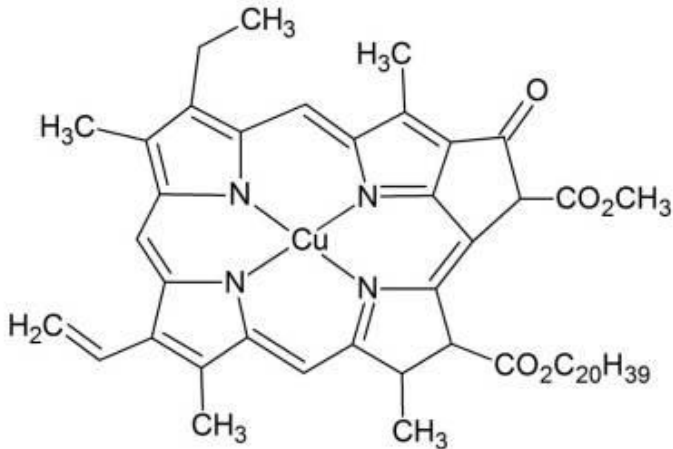
2.10 Klorofil

Klorofil merupakan katalisator yang penting pada tumbuhan terutama dalam proses fotosintesis. Klorofil terdapat dalam kloroplas dalam jumlah yang banyak, sering terikat dengan protein, tetapi mudah diekstraksi ke dalam pelarut lipid seperti aseton dan eter (Harborne, 1987).

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 (Banyo, 2011).

Klorofil terdiri dari molekul empat cincin pirol, satu dengan lainnya dihubungkan oleh gugus metana (-CH=). Pada inti molekul terdapat atom magnesium yang diikat oleh nitrogen dari dua cincin pirol dengan ikatan kovalen serta oleh dua buah atom

nitrogen dari dua cincin pirol lain dengan ikatan koordinat kovalen (Rothemund, 1956), seperti yang telah dicantumkan pada gambar 2.10.



Gambar 2.10 Struktur Molekul Klorofil (Rothemund, 1956)

Dari total pigmen hijau yang diperoleh dari daun, sekitar 72 persen adalah klorofil a dan sisanya klorofil b. Proporsinya agak bervariasi, namun tidak lebih dari 10 %. Kedua klorofil ini memiliki rumus berikut, seperti (Palladin, 1923) :

a. Klorofil a, $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$

b. Klorofil b, $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$

Menurut Tswett dalam Rothemund (1956) menetapkan bahwa beberapa tumbuhan mengandung dua pigmen hijau, yaitu klorofil a sebagai blue-green chlorophyll dan klorofil b sebagai yellow-green chlorophyll. Beberapa tumbuhan lebih banyak mengandung klorofil a daripada klorofil b. Kedua klorofil tersebut menurut Harborne (1987), memiliki perbedaan yang terletak pada struktur klorofil a yang memiliki gugus metil, sedangkan klorofil b memiliki gugus aldehida yang terikat di kanan atas cincin pirol.

“Halaman ini sengaja di kosongkan”

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Tugas Akhir

Pelaksanaan tugas akhir dilakukan pada bulan Maret sampai dengan juli 2017 di *Green house urban farming* dan Laboratorium Biosains dan Teknologi Tumbuhan, Institut Teknologi Sepuluh Nopember , Surabaya.

3.2 Bahan dan Metode

3.2.1 Pembibitan

Biji Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Var.MKY direndam didalam air selama 24 jam, benih kemudian disebar diatas nampan yang telah berisi media tanah kompos, pupuk NPK dan cocopeat dengan perbandingan 2:1:1 secara homogen. Setelah itu disemprot dengan fungisida dengan merk *dithane* untuk menghindari tumbuhnya jamur parasit. Kemudian dilakukan penyiraman sebanyak 1 kali sehari hingga tembakau memiliki 3-4 daun.

3.2.2 Perlakuan sebelum pemberian cekaman

Bibit yang telah tumbuh dan memiliki 3-4 daun dipindahkan kedalam *polybag* ukuran 3 kg dengan komposisi media tanah kompos, pupuk NPK dan *cocopeat* dengan perbandingan 2:1:1. Setelah ditanam kedalam *polybag* , bibit tembakau dibiarkan dan disirami selama 7 hari sebagai proses aklimatisasi. Kemudian bibit tembakau secara terpisah dilakukan uji pemberian PQ dengan tipe gramoxone 276SL (Syngenta^R) dengan konsentrasi (0.0005, 0.001, 0.0025, dan 0.005 %), setiap konsentrasi dilakukan 3 kali ulangan. Setelah diberi pra-perlakuan menggunakan PQ, bibit disinari dengan (40 watt s⁻²) selama 1 jam , kemudian dari setiap perlakuan diambil sampel daun sebanyak 4 g untuk selanjutnya digunakan dalam uji malondialdehyde, kandungan asam askorbat (AsA) , klorofil, dan kandungan air relatif.

3.2.3 Perlakuan setelah pemberian cekaman

Bibit yang telah tumbuh dan memiliki 3-4 daun serta telah diberi pra-perlakuan PQ dengan konsentrasi (0.0005, 0.001, 0.0025, dan 0.005 %) selanjutnya diberi cekaman kekeringan. Cekaman tersebut dilakukan dengan cara penghentian penyiraman pada tanaman selama 28 hari hari, kemudian diambil lagi sampel daun sebanyak 4 g untuk dilakukan uji malondialdehide, kandungan asam askorbat (AsA) , klorofil, dan kandungan air relatif.

3.2.4 Penentuan kadar Malonaldehyde (MDA)

Peroksidasi lipid ditentukan dengan mengukur kadar MDA mengikuti metode yang dijelaskan oleh Heath dan Packer (1968) dengan sedikit modifikasi. Daun tembakau segar sebanyak 0,5 g dihomogenisasi dengan 5 ml dari 5% (w / v) asam trikloroasetat (TCA). Kemudian disentrifugasi pada 2000 x g selama 15 menit, 2 mL supernatan yang dicampur dengan 2 ml dari 0,67% (w / v) asam thiobarbituric (TBA). Campuran diinkubasi pada 100°C selama 30 menit, dan didinginkan dengan cepat dalam es. Kemudian sampel disentrifugasi pada 2000 x g selama 5 menit, dan absorbansi supernatan ditentukan pada 450, 532, dan 600 nm. Kandungan MDA-TBA kompleks (pigmen merah) diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$c \text{ (umol L}^{-1}\text{)} = 6.45 (A_{532} - A_{600}) - 0.56 A_{450}$$

c = kandungan MDA,

A_{532} = absorbansi maksimal MDA-TBA complex

A_{600} = absorbansi minimal MDA-TBA kompleks

A_{450} = kesalahan oleh sukrosa.

3.2.5 Penentuan kadar klorofil

Penentuan kadar klorofil ditentukan berdasarkan metode yang dijelaskan oleh Wintermans and De Mots (1965), menggunakan pelarut ethanol (ethyl alcohol) 96 %.

Ditimbang sebanyak 1 gram daun tembakau lalu diekstrak (digerus dengan cawan porselin) dengan sedikit pelarut ethanol 96%, untuk mempercepat pengambilan filtrat dapat di *centrifuge* pada 1500 rpm (putaran / mnt) . Masukkan filtrat ke gelas ukur 100 ml. Kemudian tambahkan dengan pelarut yang sama hingga larutan menjadi 100 ml. kemudian kandungan klorofil diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) = 649 dan 665 nm. Kandungan klorofil diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\text{Total klorofil} = 20,0 D-649 + 6,10 D-665 \text{ (mg/l)}$$

3.2.6 Penentuan kandungan Asam askorbat

Kandungan asam askorbat ditentukan berdasarkan titrasi iodin. Daun tembakau dihaluskan hingga homogen . Ditimbang sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam gelas ukur 20 ml dengan penambahan aquades sampai tanda 20 ml. Bahan selanjutnya disaring untuk memperoleh filtrat. Filtrat diambil sebanyak 5 ml dengan pipet dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 125 ml, lalu ditambahkan 2 ml indikator amilum 1% dan aquades 20 ml. Larutan tersebut dititrasi dengan iodin 0,01 N sampai terjadi perubahan warna (biru keunguan). Perhitungan vitamin C dengan standarisasi larutan iodin yaitu pada setiap 1 ml 0,01 N iodin ekuivalen dengan 0,88 mg vitamin C (Nasution, 2012).

3.2.7 Penentuan kandungan air relatif

Kandungan air relatif ditentukan dengan metode turgiditas daun Mullan (2012), Daun tembakau dipilih secara acak, dipotong bagian ujung atas dan ujung bawahnya. Selanjutnya daun dipindah dengan cepat kedalam tabung yang telah ditimbang sebelumnya dan ditutup rapat, diletakkan pada suhu 10 – 15°C

tetapi tidak beku. Semua tabung ditimbang ($tubeW+FW$). Ditambahkan 1 cm air kedalam tabung dan ditempatkan tabung. Tabung dimasukkan kedalam kulkas (pada suhu 4°C dalam kegelapan) selama 24 jam, dan ditimbang (TW; Turgid Weight). Daun ditempatkan dalam amplop berlabel dan keringkan pada suhu 70 ° C selama 24 jam, ditimbang (DW; dry weight). Kemudian dihitung menggunakan rumus [kandungan air relatif (%) = $((FW-DW) / (TW-DW)) \times 100$]

3.2.8 Statistik

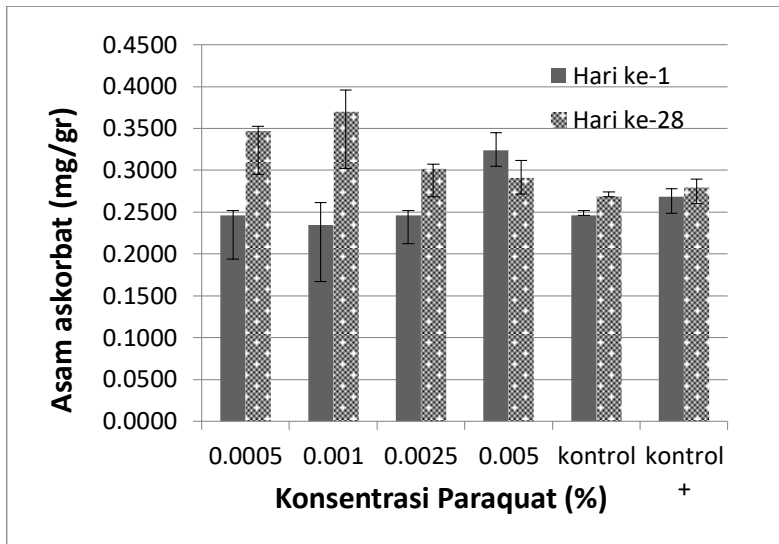
Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Penelitian ini menggunakan 6 perlakuan (perlakuan dengan PQ 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.005%, kontrol, dan kontrol+). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4 kali Selanjutnya, data dianalisa menggunakan ANOVA one-way dan Least Significant Difference (LSD). P-values <0.05 dianggap signifikan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kandungan Asam Askorbat

Salah satu respon yang umum terjadi pada saat tanaman menghadapi cekaman biotik maupun abiotik adalah diakumulasinya antioksidan (Hossain *et al.*, 2016). Jenis dan konsentrasi antioksidan yang diakumulasi juga bersifat *species-dependent*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman yang berada pada kondisi tercekam kekeringan mampu meningkatkan biosintesis antioksidan enzimatis dan non enzimatis (Akinci *et al.*, 2012). Salah satu contoh antioksidan non enzimatis adalah asam askorbat (AsA). Pada penelitian ini, pengaruh pemberian paraquat terhadap kandungan AsA dilakukan pada hari ke-1 dan ke-28 setelah dicekam kekeringan menggunakan titrasi iodin.

Kandungan AsA *N.tabacum* pada hari ke-1 pemberian cekaman kekeringan memiliki rata-rata sebesar 0.2608 mg/gr, dengan kandungan AsA terendah berada pada *N. tabacum* yang diberi pra-paraquat dengan konsentrasi 0,001% sebesar 0.2347 mg/gr, dan kandungan tertinggi berada pada *N. tabacum* yang diberi perlakuan paraquat dengan konsentrasi 0.005% sebesar 0.3241 mg/gr. Sedangkan pada hari ke-28 setelah pemberian cekaman kekeringan, pemberian pra-perlakuan dengan paraquat tampak berpengaruh terhadap kandungan AsA ($\alpha < 0.005$). Rata-rata kandungan AsA di semua *N. tabacum* pada hari ke-28 mengalami peningkatan sebesar 0. 0.3094 mg/gr. Pemberian pra-perlakuan paraquat pada hari ke 28 ini menunjukkan pengaruh signifikan terhadap kandungan AsA pada *N. tabacum* yang diberi paraquat dengan konsentrasi 0.001% jika dibandingkan dengan kontrol yaitu sebesar 0.3694 mg/gr (LSD <0.005) (Gambar 1).

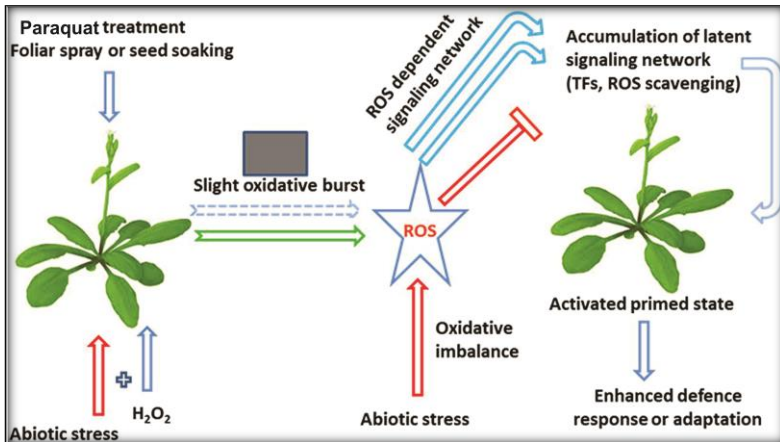


Gambar 4.1. Pengaruh pemberian pra-perlakuan paraquat dan cekaman kekeringan terhadap kandungan asam askorbat pada daun *N. tabacum*.

Perlakuan	Rata – rata kandungan AsA ± stdev (mg/gr)	
	Hari ke- 1	Hari ke- 28
0.0005	0.245 ± 0.006	0.346 ± 0.0518
0.001	0.234 ± 0.027	0.369 ± 0.0675
0.0025	0.245 ± 0.006	0.301 ± 0.0335
0.005	0.324 ± 0.021	0.290 ± 0.0192
kontrol	0.245 ± 0.006	0.268 ± 0
kontrol +	0.268 ± 0.001	0.279 ± 0.0192

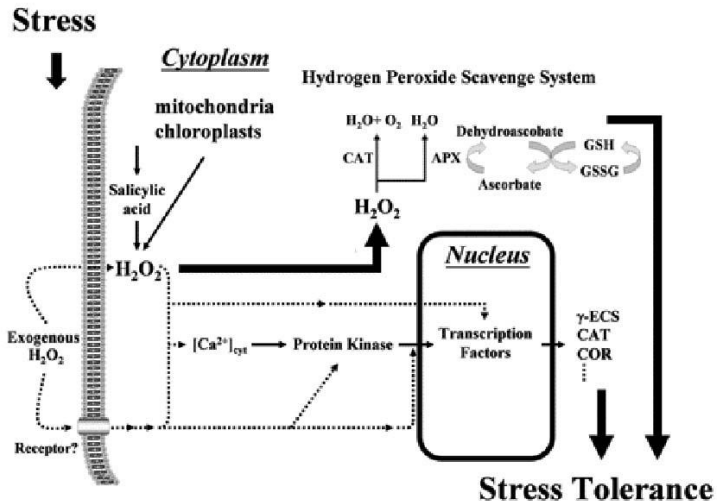
Tabel 4.1. Pengaruh pemberian pra-perlakuan paraquat dan cekaman kekeringan terhadap kandungan asam askorbat pada daun *N. tabacum*.

Paraquat merupakan senyawa organik yang pada umumnya digunakan sebagai salah satu komponen herbisida, yang bersifat polar yang masuk kedalam sel tumbuhan melalui mekanisme difusi pasif pada membrane sel, difusi pasif merupakan mekanisme masuknya molekul melewati membrane dengan menggunakan pergerakan gradient konsentrasi sehingga tidak memerlukan energy (Sterling, 1994). bertindak sebagai alternatif akseptor elektron yang mengambil elektron dari protein Fe-S pada fotosistem I. Selain itu, paraquat juga menghambat reduksi ferredoksin dan produksi NADPH. Selain itu, beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa paraquat berfungsi sebagai senyawa organik yang mampu menginduksi terjadinya stres oksidatif karena mampu meningkatkan secara signifikan produksi ROS. Keberadaan ROS dapat memberikan dampak negatif bagi tanaman pada konsentrasi tinggi. Meskipun demikian, penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang relative rendah, ROS dapat berfungsi sebagai *second messenger* (Cocheme & Murphy, 2008). ROS yang lebih rendah sebagai molekul persinyalan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman seperti pemanjangan sel (Foreman *et al.*, 2003), diferensiasi (Tsukagoshi dkk., 2010), morphogenesis serta tanggapan terhadap berbagai rangsangan lingkungan (Gambar 2), utamanya dalam meningkatkan kandungan senyawa AsA (Liu *et al.*, 2009). Diantara senyawa ROS yang mampu diinduksi oleh paraquat, hydrogen peroxide (H_2O_2) merupakan salah satu ROS yang diproduksi dalam konsentrasi yang relative lebih tinggi dibandingka ROS lainnya dan memiliki karakteristik berukuran molekul kecil sehingga memungkinkan untuk terjadinya difusi melalui membran sel dan terjadinya perpindahan dari kompartemen seluler yang satu ke kompartemen seluler lainnya untuk memfasilitasi proses signal transduksi (Bienert *et al.*, 2006).



Gambar 4.2. Pengaruh pra-perlakuan paraquat pada mekanisme pertahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan

AsA merupakan salah satu senyawa antioksidan paling kuat (Noctor *et al.*, 1998) yang berperan penting dalam mengatasi produk ROS (Ye *et al.*, 2012). Biosintesis AsA terjadi di mitokondria melalui beberapa jalur, jalur utama yang paling jelas adalah Smirnov-Wheeler jalur yang juga disebut jalur D-mannose / L-galaktosa (Wheeler *et al.*, 1998). Kemampuan asam askorbat dalam mengatasi ROS dapat dijelaskan pada siklus *ascorbate-glutathione* (Gambar 3).



Gambar 4.3. Siklus *Ascorbate-glutathione* (Felipe *et al.*, 2005).

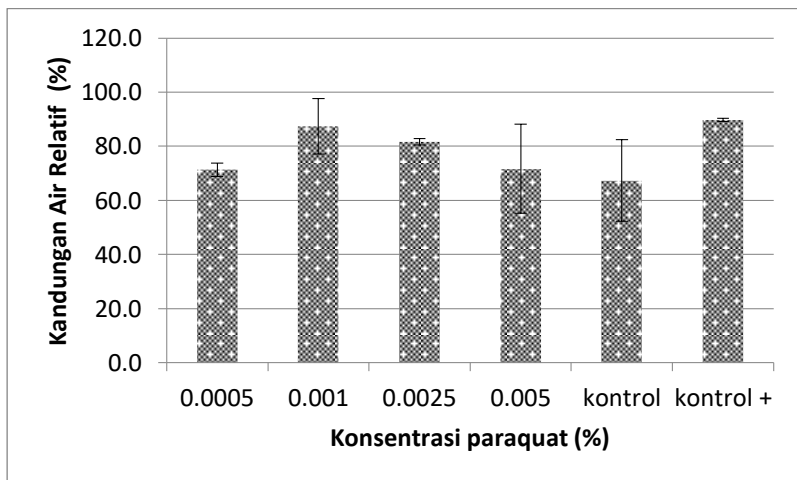
Siklus *glutathione-ascorbate* adalah jalur metabolik yang berperan dalam mendetoksifikasi H_2O_2 , yang dihasilkan sebagai produk samping sebuah proses metabolisme. Siklus ini melibatkan beberapa jenis antioksidan seperti AsA, glutathione, NADPH dan beberapa enzim lainnya (Noctor and Floyer, 1998). Pada siklus ini, H_2O_2 akan direduksi menjadi air oleh *askorbat peroksidase* (APX) dengan menggunakan AsA sebagai donor electron (Gambar 3). Askorbat teroksidasi (*monodehydroascorbate*) kemudian diregenerasi oleh *monodehydroascorbate* reduktase (MDAR) (Wells *et al.*, 1994). Namun, *monodehydroascorbate* pada dasarnya adalah radikal dan jika tidak cepat direduksi, maka akan menjadi askorbat dan dehidroaskorbat. Dehidroaskorbat selanjutnya akan di reduksi menjadi askorbat oleh dehidroaskorbat reduktase, menghasilkan glutathione teroksidasi (GSSG). Selanjutnya, GSSG akan direduksi oleh *glutathione reductase* (GR) menggunakan NADPH sebagai donor elektron. Mekanisme inilah yang digunakan oleh tanaman dalam merespon adanya stress oksidatif. Namun

demikian, adanya enzim antioksidan lainnya seperti *peroksiredoxins* dan *glutathione peroxidases* juga dilaporkan memiliki fungsi penting dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan (Rouhier *et al.*, 2002).

Pemberian pra perlakuan menggunakan paraquat dengan konsentrasi tertentu diperkirakan mampu meningkatkan kandungan AsA endogen pada *N. tabacum* sehingga mampu bertahan dalam menghadapi cekaman kekeringan. Hal ini juga serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Athar *et al.* (2008) dan Liu *et al.* (2009) yang menunjukkan bahwa peningkatan antioksidan dapat diinduksi dengan penggunaan *inducer* eksogen dan hal tersebut berpengaruh positif terhadap ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Ishibashi *et al.* (2011) menunjukkan bahwa penyemprotan tanaman dengan H_2O_2 dapat meringankan stres kekeringan pada kedelai. Temuan tersebut menunjukkan bahwa H_2O_2 dapat memicu aktivasi mekanisme pertahanan seperti KAR, laju fotosintesis dan konduktansi stomata daun yang tertekan kekeringan termasuk peningkatan kadar antioksidan, yang membantu meringankan kerusakan dan memperbaiki pertumbuhan dan kinerja tanaman di bawah kekeringan.

4.2 Kandungan Air Relatif

Kandungan air relatif (KAR) merupakan salah satu parameter yang digunakan dalam mengevaluasi status kandungan air sebagai respon ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan. Penurunan nilai KAR dapat dipertimbangkan sebagai bukti tidak langsung terhadap tingginya level cekaman kekeringan serta sebagai parameter sensitivitas tanaman terhadap cekaman kekeringan.



Gambar 4.4. Pengaruh pemberian pra-perlakuan paraquat dan cekaman kekeringan terhadap kandungan air relatif daun *N. tabacum*.

Presentase kandungan air relatif tembakau di hari ke-28 setelah pemberian pra-perlakuan paraquat dan cekaman kekeringan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif (tanpa pra-perlakuan paraquat dan cekaman kekeringan) yang memiliki presentase KAR sebesar 89.7%.

Perlakuan	Rata – rata kandungan KAL ± stdev (%)
	Hari ke- 28
0.0005	71.3 ± 2.517
0.001	87.3 ± 10.263
0.0025	81.7 ± 1.155
0.005	71.7 ± 16.442
kontrol	67.3 ± 15.044
kontrol +	89.7 ± 0.577

Table 4.2 Pengaruh pemberian pra-perlakuan paraquat dan cekaman kekeringan terhadap kandungan air relatif daun *N. tabacum*.

Meskipun demikian, kandungan air di semua tanaman *N. tabacum* var MKY yang diberi pra-perlakuan juga lebih tinggi dibandingkan tanaman control negatif (tanpa pemberian paraquat tetapi diberi perlakuan cekaman kekeringan) (67.3%). Kandungan air relatif tertinggi ditunjukkan pada tanaman yang diberi paraquat dengan konsentrasi 0.001% yaitu sebesar 87.3%. Pemberian pra-perlakuan dengan paraquat sebesar 0.0005% memberikan dampak pada rendahnya prosentase KAR (71,3%) (Gambar 4).

KAR merupakan indikator penting status air pada tanaman. Indikator ini mencerminkan keseimbangan antara suplai air ke jaringan daun dan tingkat transpirasi (Lugojan dan Ciulca 2011). Turunnya prosentase KAR pada *N. tabacum* yang dicekam kekeringan disebabkan oleh menurunnya tingkat kelembaban tanah. Hal ini menyebabkan kadar air dalam tanah yang dapat diserap oleh tanaman juga mengalami penurunan. Sementara itu, penurunan kadar air tersebut berbanding terbalik dengan laju transpirasi. Kondisi ini menyebabkan tanaman melakukan respon, salah satunya, dengan cara meningkatkan biosintesis hormon asam absisat (ABA). Akumulasi ABA, utamanya dalam sel

penjaga stomata selanjutnya akan memediasi penutupan stomata (Schroeder *et al*, 2001). ABA mengaktifkan celah anion (*Anion channel*) yang berada pada plasma membrane sel penjaga. Hal ini menyebabkan aktifnya proses difusi ion potassium (K^+) keluar sel. Sebaliknya, ion kalsium (Ca^{2+}) akan berdifusi masuk ke dalam sel. Di sisi yang lain, produksi ROS yang tinggi pada saat tanaman tercekam kekeringan juga meregulasi penutupan stomata. Akumulasi ROS pada dinding sel penjaga juga dapat mengaktifkan saluran anion (Pei *et al.*, 2000).



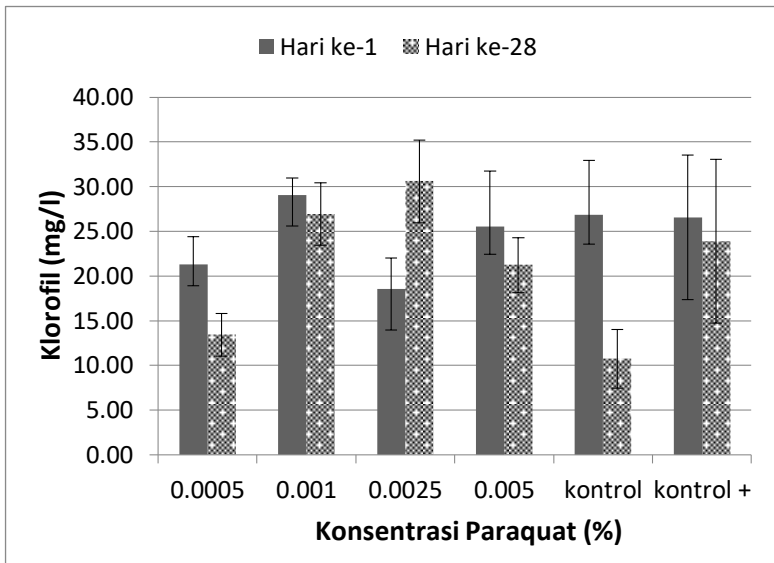
Gambar 4.5. Perbandingan kondisi morfologi *N. tabacum* di hari ke-28.

Meskipun demikian, tanaman tersebut memiliki nilai KAR yang lebih tinggi dibandingkan *N. tabacum* yang hanya diberi cekaman kekeringan (tanpa pra-perlakuan dengan paraquat) (Gambar 5). Tanaman yang diberi pra-perlakuan menggunakan paraquat memiliki morfologi daun yang lebih segar, sedangkan daun pada tanaman control tampak layu. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh ROS utamanya H_2O_2 yang diinduksi oleh paraquat mampu meningkatkan ekspresi dari gen pengkode enzim yang meregulasi sintesa osmolit dan protein yang berperan sebagai osmoprotektan. Osmolit dan protein osmoprotektan inilah yang membuat tanaman mampu mempertahankan kadar air pada saat tercekam kekeringan.

Penelitian serupa yang dilakukan oleh Ishibashi (2011) dengan melakukan pra-perlakuan menggunakan H_2O_2 pada kacang kedelai *Glycine max* L. yang dicekam kekeringan terbukti mampu meningkatkan KAR dengan cara aktivasi enzim *galactinol synthase* (GolS) yang memiliki fungsi sebagai osmoprotectants. Selain itu H_2O_2 juga mampu meningkatkan ekspresi gen *GmMIPS2* yang dimungkinkan terlibat pada persinyalan ROS yang dihasilkan oleh cekaman kekeringan. .

4.3 Kandungan Klorofil Daun

Kandungan klorofil merupakan salah satu faktor penting yang menentukan laju fotointesis dan produktifitas tanaman. (Li *et al.*, 2006).



Gambar 4.6 Pengaruh pra-perlakuan paraquat dan cekaman kekeringan terhadap kandungan klorofil *N. tabacum*

Perlakuan	Rataa-rata kandungan klorofil total (mg/l) \pm stdev	
	1 hari cekaman	28 hari cekaman
0.0005	21.29 \pm 3.1	13.44 \pm 2.37
0.001	29.06 \pm 1.89	26.94 \pm 3.48
0.0025	18.58 \pm 3.46	30.58 \pm 4.61
0.005	25.56 \pm 6.17	21.22 \pm 3.09
kontrol	26.84 \pm 6.07	10.76 \pm 3.27
kontrol +	6.96 \pm 6.96	23.89 \pm 9.15

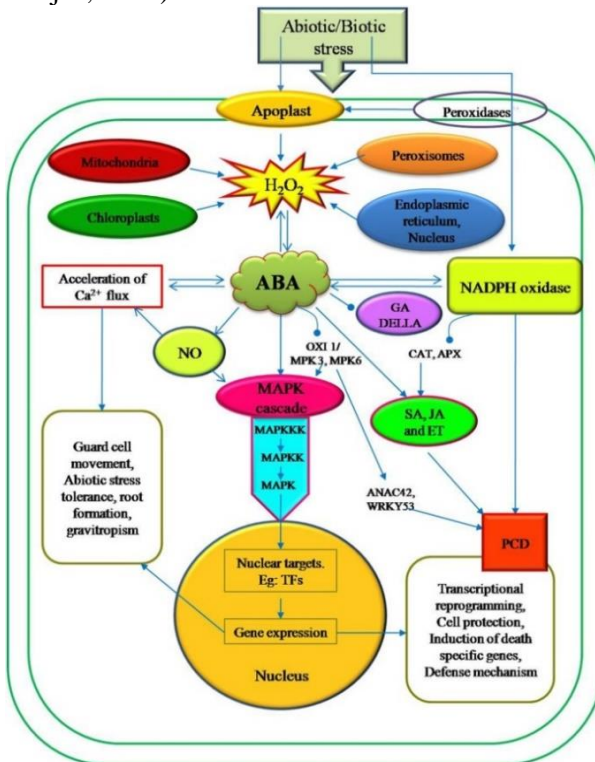
Tabel 4.3 Pengaruh pra-perlakuan paraquat dan cekaman kekeringan terhadap kandungan klorofil *N. Tabacum*

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa salah satu dampak dari cekaman kekeringan adalah perubahan kandungan klorofil serta deformasi struktur kloroplas (Bhattacharjee, 2012). Pengukuran kandungan klorofil dilakukan pada hari ke-1 dan ke-28 setelah pemberian cekaman kekeringan dengan metode uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer.

Kandungan klorofil *N. tabacum* pada hari ke-1 pemberian cekaman kekeringan memiliki rata-rata sebesar 24.65 mg/l. Kandungan klorofil terendah berada pada *N. tabacum* yang diberi pra-perlakuan paraquat dengan konsentrasi 0.0025%, yaitu sebesar 18.58 mg/l, sedangkan kandungan tertinggi berada pada konsentrasi 0.001% sebesar 29.06 mg/l. Pada hari ke-28, rata-rata kandungan klorofil relatif mengalami penurunan sebesar 21.14 mg/l (Gambar 6), Hal ini menunjukkan bahwa pra-perlakuan paraquat yang dilanjutkan dengan pemberian cekaman selama 28 hari berpengaruh terhadap kandungan klorofil tanaman *N. tabacum* var. MKY ($\alpha < 0.005$) dengan perlakuan yang paling berbeda nyata adalah pada konsentrasi 0.0025% (LSD < 0.005) dibandingkan dengan kontrol.

Pada perlakuan paraquat dengan konsentrasi 0.0025%, di hari ke 28 setelah cekaman kekeringan terbukti meningkatkan

kandungan klorofil dibanding pada pengukuran hari ke-1. Peningkatan konsentrasi klorofil ini dimungkinkan karena konsentrasi paraquat yang digunakan relative rendah dan optimum sebagai *second messenger* pada tanaman. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa paraquat dengan konsentrasi tertentu mampu berperan sebagai induktor ROS khususnya H_2O_2 , dan berperan sebagai regulator transduksi sinyal respon tanaman terhadap cekaman lingkungan (Bhattacharjee, 2012).



Gambar 4.7. Representasi skematik generasi H_2O_2 di berbagai situs seluler intra dan ekstra dan keterlibatannya dalam berbagai jalur pensinyalan yang terkait dengan regulasi ekspresi gen pertahanan pada sel tumbuhan.

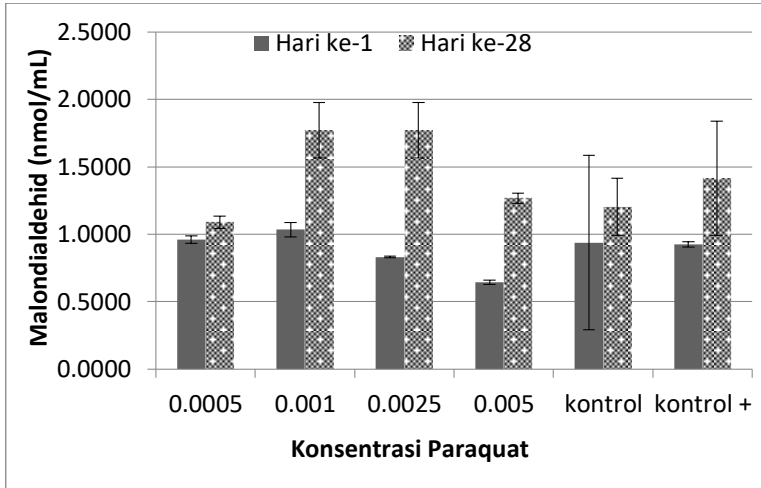
ROS pada rentang kadar tertentu yang diproduksi pada saat tanaman tercekam kekeringan mampu memodulasi gen-gen yang berperan dalam biosintesis klorofil. Hubungannya dengan peningkatan kandungan klorofil ketika cekaman kekeringan, dimungkinkan H_2O_2 yang dihasilkan oleh cekaman oksidatif mampu mengaktifkan MAPK (MPK3 dan MPK6) melalui MAPK kinase kinase (MAPKKK) ANP1 (Kovtun *et al.*, 2000). MKP2 adalah pengatur utama jaringan MPK3 dan MPK6 yang terlibat dalam mengendalikan respons stres abiotik dan biotik (Gambar 7) (Zhou *et al.*, 2012).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Yuan (2012) jalur pensinyalan ABA dimediasi oleh *H subunit of Mg-chelatase* (CHLH) yang salah satu fungsinya adalah mengkelat magnesium ke protoporphirin IX, yang menyediakan Mg-ProtoIX dalam jalur biosintesis klorofil (Papenbrock *et al.* 2000), dan pensinyalan ABA tidak lepas dari pensinyalan silang dengan H_2O_2 (Saxena *et al.*, 2016)

4.4 Kandungan Malondialdehyde

Kandungan *malondialdehyde* (MDA) *Nicotiana tabacum* pada hari ke-1 pemberian cekaman kekeringan memiliki rata-rata sebesar 0.8825 mmol, dengan kandungan terendah berada pada perlakuan paraquat dengan konsentrasi 0.005% sebesar 0.645 mmol, dan kandungan tertinggi berada pada konsentrasi 0.001% sebesar 1.035 mmol.

Pengukuran di hari ke-28 perlakuan paraquat mengalami peningkatan kandungan MDA, dengan rata-rata menjadi 1.4211 nmol, dengan kandungan terendah berada pada perlakuan paraquat dengan konsentrasi 0.0005% sebesar 1.09 nmol, dan kandungan tertinggi berada pada konsentrasi 0.001% dan 0.0025% sebesar 1.772 nmol (Gambar 8).



Gambar 4.8. Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap kandungan malondialdehid pada *N.tabacum* yang dicekam kekeringan

Perlakuan	Rata-rata kandungan MDA (mg/l) \pm stdev	
	Hari ke-1	Hari ke-28
0.0005	0.9625 \pm 0.028	1.09 \pm 0.0453
0.001	1.035 \pm 0.054	1.772 \pm 0.2065
0.0025	0.832 \pm 0.004	1.772 \pm 0.2065
0.005	0.645 \pm 0.017	1.268 \pm 0.0368
kontrol	0.938 \pm 0.645	1.2035 \pm 0.2114
kontrol +	0.9255 \pm 0.9255	1.4155 \pm 0.425

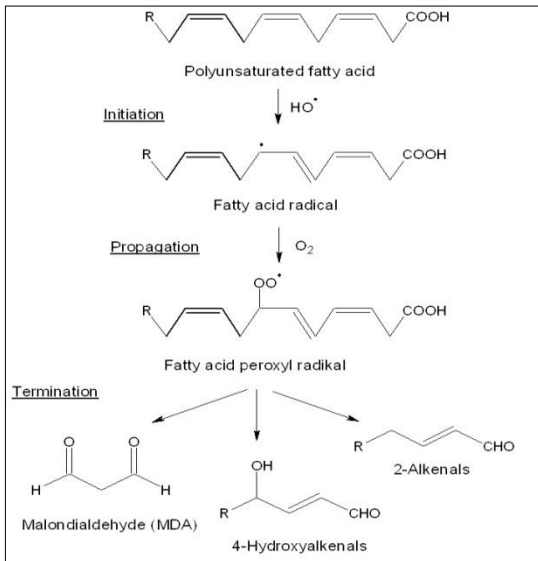
Tabel 4.4 Pengaruh pra-perlakuan paraquat terhadap kandungan malondialdehid pada *N.tabacum* yang dicekam kekeringan

MDA merupakan aldehida reaktif yang merupakan indikator dari peroksidasi lipid (Ohkawa *et al.*, 1979). Perlakuan pra-perlakuan menggunakan paraquat pada *N. tabacum* var. MKY memberi dampak kerusakan pada daun yang bersifat *irreversible* (Lehokzki, 1992)(Gambar 9). Kerusakan daun ini terjadi karena peroksidasi lipid yang disebabkan oleh paraquat . Peroksidasi lipid adalah degradasi oksidatif lipid, reaksi berantai yang diinisiasi oleh pemisahan hidrogen atau penambahan radikal oksigen, yang mengakibatkan kerusakan oksidatif asam lemak tak jenuh ganda (PUFA). Ini adalah proses dimana radikal bebas mengambil elektron dari lipid di membran sel, mengakibatkan kerusakan sel.



Gambar 4.9. Kondisi morfologi daun tembakau setelah diberikan perlakuan menggunakan paraquat.

Proses ini dilanjutkan dengan mekanisme reaksi berantai radikal bebas. Ini paling sering mempengaruhi asam lemak tak jenuh ganda, karena mengandung banyak ikatan rangkap di antaranya yang merupakan jembatan metilen (-CH₂-) yang memiliki atom hidrogen reaktif secara khusus. Seperti halnya reaksi radikal, reaksi terdiri dari tiga langkah utama: inisiasi, propagasi, dan penghentian. Produk kimia dari oksidasi ini dikenal sebagai lipid peroksida atau produk oksidasi lipid (LOP) (Ayala *et al.*, 2014)



Gambar 4.10. Proses terjadinya peroksidasi lipid .(Halliwell & Gutteridge, 1984)

Kandungan MDA pada *N.tabacum* (Gambar 8.) mengalami peningkatan pada hari ke-28 di semua perlakuan, hal ini dikarenakan cekaman kekeringan menginduksi terbentuknya ROS (Mittler *et al.*, 2002) dimana ROS utamanya Hidroksil radikal (-OH) bereaksi dengan asam lemak takjenuh ganda. Hal ini menyebabkan pembentukan asam lemak radikal, sehingga terjadi reaksi berantai hingga terbentuknya MDA (Gambar 10.)

(Halliwell & Gutteridge, 1984), semakin tinggi tingkat kekeringan maka ROS yang dihasilkan akan semakin meningkat membuat terjadinya peroksidasi lipid dan meningkatkan kandungan MDA pada sel.

Uji statistika menggunakan ANOVA One way menunjukkan bahwa pemberian paraquat pada pengukuran di hari ke-28 cekaman kekeringan tidak berpengaruh signifikan terhadap kandungan MDA ($\alpha > 0.05$) hal ini merupakan berita baik, dapat dimungkinkan bahwa konsentrasi paraquat yang digunakan pada penelitian ini dinilai telah sesuai sebagai *second messenger* karena tidak berpengaruh secara signifikan terhadap kerusakan membran daun. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan hasil yang berlawanan, seperti yang dilakukan oleh Liu *et al* (2009) yang melakukan pretreatment menggunakan paraquat dengan konsentrasi yang berbeda pada daun mentimun (*Cucumis sativus*) yang dicekam kekeringan membuktikan bahwa aplikasi paraquat meningkatkan kandungan MDA ($\alpha < 0.01$)

Selain karena pengaruh pretreatment menggunakan paraquat, kemampuan *N. tabacum* dalam bertahan menghadapi cekaman kekeringan juga dikarenakan varietas yang digunakan merupakan salah satu varietas yang paling tahan terhadap cekaman kekeringan. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Erma (2016) menyatakan varietas MKY adalah varietas yang mampu meningkatkan Gen-gen responsive terhadap cekaman kekeringan seperti NeLTP1, NtABA2 dan NteERD10B dengan konsentrasi yang paling tinggi dibanding varietas burley lain (jepun mawar dan marakot)

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN

Pemberian pra-perlakuan menggunakan paraquat dengan konsentrasi 0.0005, 0.001, 0.0025, dan 0.005% terbukti mampu meningkatkan kandungan senyawa antioksidan berupa asam askorbat, meningkatkan biosintesis klorofil, dan menjaga kandungan air relatif daun pada kondisi tercekam kekeringan, namun tidak signifikan terhadap kandungan malondialdehid yang merupakan indikator terjadinya peroksidasi lipid pada jaringan. Pra-perlakuan paraquat dengan konsentrasi 0.001% dinilai merupakan konsentrasi yang paling optimal sebagai *second messenger* untuk meningkatkan respon *N. tabacum* dibawah cekaman kekeringan .

SARAN

Penelitian lanjutan berupa analisis molekular perlu dilakukan untuk mengetahui secara spesifik gen dan enzim yang terlibat dalam respon pemberian pra-perlakuan paraquat pada *N. tabacum* yang tercekam kekeringan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

Abiri, R., Noor, A., Mahmood, M., Zetty, Norhana, Y., Narges, A., Mahmod, S., Alireza, V., Nahid, K., Parisa, A. 2017. Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions Rambod Abiri. **Environmental and Experimental Botany**134: 33–44.

Ai, N.S. dan Y. Banyo. 2011. Konsentrasi klorofil daun sebagai indikator kekurangan air pada tanaman. **Jurnal Ilmiah Sains** 11: 166 – 171.

Ail, N., Torey, P. 2013. Karakter morfologi akar sebagai indikator kekurangan air pada tanaman (Root morphological characters as water-deficit indicators in plants). **Tesis**. Departemen Biologi FMIPA Universitas Sam Ratulangi Manado.

Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology** 55: 373-399

Aysin,F.,Bensan,.E.,Elif.,Eyidogan,F.2015.Generating salt-tolerant *Nicotiana tabacum* and identification of stress-responsive mRNAs in transgenics. **Turkish Journal of Botany**. 2015: 39: 757-768

Bhattacharjee S. 2012. The language of reactive oxygen species signaling in plants. *J. Bot.* 2012:22 10.1155/2012/985298

Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., and Jahn, T. P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994–1003. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.015

Biolab Medical Unit. 2010. Carotenoid. BIOLAB. Ltd. London, England. P.1.

Biranti, F., M. Nursid dan B. Cahyono. 2009. Analisis Kuantitatif B-karotenoid dan Uji Aktivitas Karotenoid dalam Alga Coklat *Turbinaria decurrens*. Jurnal Sains & Matematika (JSM). Jakarta. Vol. 17 No.2. hal. 90

Bosch L, Tilkin P, Lemmens G, Robberecht W.2002. Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS. **Neuroreport** 13:1067–1070.

Chia LS, McRae DG, Thompson JE .1982. Light-dependence of paraquat-initiated membrane deterioration in bean plants: Evidence for the involvement of superoxide. **Plant Physiol.**, 56: 492-499.

Cocheme H. M., Murphy M. P. 2008. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. **J. Biol. Chem.** 283 1786–1798. 10.1074/jbc.M708597200

Darvishzadeh ,R.,Mirzaei,L.,Maleki,H.,Lauretin,H.2013. Genetic variation in oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by agromorphological traits and simple sequence repeat markers. **Revista Ciência Agrônômica** v. 44, n. 2, p. 347-355

Davalieva,K.,Maleva,I.,Filiposki,K.Spiroski,O.,Efremov,G.2010. Genetic Variability of Macedonian Tobacco Varieties Determined by Microsatellite Marker Analysis. **Diversity** , 2, 439-449; doi:10.3390/d2040439

Davey MW1, Stals E, Panis B, Keulemans J, Swennen RL.2005. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. **Analytical Biochemistry.** 347 (2): 201–207.

Denduangboripant,J.2010.Genetic Polymorphism between Tobacco Cultivar-groups Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. **Journal of Agricultural Science** . 2010 : Vol. 2 No. 2

Dubey R.S., Pessarakli M. .1995. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. In: Pessarakli M. (eds.): Handbook of Plant and Crop Physiology. Marcel Decker Inc., New York, Basel, Hong Kong.

Esmaeilpour,A.,Marie,C.,Roeland,S.,Pascal,B.,Patrick,V.2016. Variation in biochemical characteristics, water status, stomata features, leaf carbon isotope composition and its relationship to water use efficiency in pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars under drought stress condition. **Scientia Horticulturae** Volume 211, Pages158–166

Evans PJ, Gallesi D, Mathieu C, Hernández MJ, de Felipe M, Halliwell B, Puppo A. 1999 Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. **Planta** 208 73–79

Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., et al. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature** 422 442–446. 10.1038/nature01485

Hamim. 2004. Underlying Drought Stress Effect on Plant: **Inhibition of Photosynthesis**. J Hayati 11(4):164- 169.

Harborne, J.B.1987. Metode Fitokimia, Edisi ke dua, ITB, Bandung.

Henry, G. A.F. and J. P. Grime. 1993. Methods on Comparative Plant Ecology, A Laboratory Manual. Chapman and Hill. London

Hysková ,V., Miedzinska.,Dobra,J. 2014. Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate

dikinase are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress. **Journal of Plant Physiology** . 171 .19–25.

Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S., and Zheng, S-H. .2011. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. **J. Plant Physiol.** 168, 1562–1567.

kader J C .1996.Lipid transfer proteins in plants. **annu rev plant physiol plant Mol Biol** 47: 627-654

Kishore,K.2014.Monograph Of Tobacco (*Nicotiana tabacum*).**Indian Journal Of Drugs** 2:2349-1684

Kovtun, Y. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 97, 2940–2945

Lascano,R.,Nacira,M.,German,R.,Marianela,R.,Mariana,M.,Victorio,T.,Gaston,Q.2012. Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds.China:Intech open science

Liu, Z.,Zhang,X.2009. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. **Scientia Horticulturae** 121 138–143

Lugojan C. and Ciulca S. .2011. Evaluation of relative water content in winter wheat. **J. Hortic. Fores. Biotechnol.** 15: 173–177

Martinez,N.,Pedro,A.,Joaquin,A.,Antonia,P.,Antonio,C.,Ruben,B, Juan,C.2017. Optimization of non-catalytic transesterification of tobacco (*Nicotiana tabacum*) seed oil using supercritical methanol to biodiesel production. **Energy Conversion and Management** 131 :99–108

May, J., Zhi, C., Charles, E., James, M. 1999. Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**, Volume 26

Mckersie BD, Chen Y, De Bens M, Bowley SR, Bowler C, Inze D, Dittainin K, Botterman T. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*, L.). **Plant Physiol.** 103: 1155.

Meyer, A.J. 2008. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. **J. Plant Physiol.** 165, 1390–1403.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.** 7 405–410. 10.1016/S1360-1385(02)02312-9

Moore K, Roberts LJ 1998. Measurement of lipid peroxidation. **Free Radic. Res.** 28 (6): 659–71.

Munné-Bosch, S., Schwarz, K., Alegre, L.: Water deficit in combination with high solar radiation leads to midday depression of α -tocopherol in field-grown lavender (*Lavandula stoechas*) plants. - **Aust. J. Plant Physiol.** 28: 315-321, 2001.

Nasution, I. S., Yusmanizar dan Melianda, K. 2012. Pengaruh Penggunaan Lapisan Edibel (Edible Coating), Kalsium Klorida, Dan Kemasan Plastik Terhadap Mutu Nanas (*Ananas comosus* Merr.) Terolah Minimal. Banda Aceh: Universitas Syiah Kuala, Darussalam. 4 (2) : 21-26

Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., Chapple, S., Cohen, G., Feher, J., Grune, T., 2010. Pathological aspects of lipid peroxidation. **Free Radic. Res.** 44,

Noctor G, Foyer CH . 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 49: 249–279

Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 49: 249–279

Nxele, X., Klein, A., Ndimba, B. Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. **South African Journal of Botany** 108 (2017) 261–266

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**. ;95:351–358.

Palladin, V. I. 1923. Plant physiology, Philadelphia, 2nd edition.

Papenbrock J, Mock HP, Tanaka R, Kruse E, Grimm B. 2000. Role of magnesium chelatase activity in the early steps of the tetrapyrrole biosynthetic pathway. **Plant Physiol.** a;122:1161–1169.

Patakas A, Nikoanou N, Zioziou E, Radoklou K, Noitsakis B. 2002. The role of organic solute and its accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Sci** 163:361-367.

Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. **Nature** 406 731–734.

Popova L, Ananieva E, Hristova V, Christov K, Georgieva K, Alexieva V, Stoinova Z .2003. Salicylic acid and methyl jasmonate induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. *Bulg. J. Plant Physiol.* **Special Issue**: 133-152.

Pritchard RJ, Ghio AJ, Lehmann J, Winsett D. 1996. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure

increase with the concentrations of associated metals. **Inhal Toxicol** 8:457–477.

Procházková, D. Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Singh, D.V.: Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. **Plant Sci.** 161: 765-771, 2001.

Quilambo OA. 2004. Proline content, water retention capability and cell membrane integrity as parameters for drought tolerance in two peanut cultivars. *South African J Bot* 70:227-234

Rachmat, Muchcin. 2010. Pengembangan ekonomi tembakau nasional: kebijakan Negara maju dan pembelajaran bagi Indonesia. Analisis kebijakan pertanian. Volume 8 no.1: 67-83

Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP .2002. Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. **J Biol Chem** 277: 13609–13614

Ru, Q., Li-juang, W., Li, W., Wang, J., Yu-ting, D. 2012. In Vitro Antioxidant Properties of Flavonoids and Polysaccharides Extract from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Leaves. **Molecules**, MDPI, 17, 11281-11291; doi:10.3390/molecules170911281

Saxena I, Srikanth S and Chen Z .2016. Cross Talk between H₂O₂ and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response. *Front. Plant Sci.* 7:570. doi: 10.3389/fpls.2016.00570

Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ. 2001. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. **Nature.** 410:327–330.

Sgherri CLM, Navari-Izzo F .1995 Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. **Physiol Plant** 93: 25–30

Shuai,C., Guan-shan,L., Wang,Y., Sun,Y., Chen,J.2011. Cloning of a Calcium-Dependent Protein Kinase Gene NtCDPK12, and Its Induced Expression by High-Salt and Drought in *Nicotiana tabacum*. **Agricultural Sciences in China** 10(12): 1851-1860

Socr,J.,Cinkova,K.,Scorc,K.2014.Degradation Markers in Nutritional Products a Review.**Journal of Pharmaceutical Chemistry**. Vol 1(1):1005

Sonja V.,Graham,N.,Christine,H..2002. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate.**Plant Physiology and Biochemistry**, Volume 40 Pages 501-507

Stange,C. and C. Flores. 2012. Carotenoids and Photosynthesis - Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors In *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*. InTech. Rijeka, Croatia. p.77.

Sterling, T.M. 1994. Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.* 42:263-276.

Sun,J.Jing,G.,Jun,Z.,Shuang,H.,Aiping,S.,Fadi,C.,Weimin,F.,Jiafu,J.,Sumei,C.2013. Changes in leaf morphology, antioxidant activity and photosynthesis capacity in two different drought-tolerant cultivars of chrysanthemum during and after water stress. **Scientia Horticulturae** 161 : 249–258

Taiz L, Zeiger E, 1991. *Plant Physiology*. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Tsakagoshi H., Busch W., Benfey P. N.2010. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to

differentiation in the root. **Cell** 143 606–616.
10.1016/j.cell.2010.10.020

Waseem M, Athar H, Ashraf M .2006. Effect of salicylic acid applied through rooting medium on drought tolerance of wheat. **Pakistan Journal of Botany**

Watts.2011.Paraquat.Pesticide Action Network Asia and the Pacific. Malaysia

Wells WW Xu DP Yang YF Rocque PA . 1990. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. **Journal of Biological Chemistry** . 265, 15361–15364.

WheelerGL, Jones MA, Smirnoff N.1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature** 393: 365–369.

Yue,Y.,Mingcai,Z.,Jiachang,Z.,Liusgheng,D.,Zhaohu,L.2011. Arabidopsis LOS5/ABA3 overexpression in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) results in enhanced drought tolerance. **Plant Science** 181 :405–411

Zhou J., Wang J., Shi K., Xia X. J., Zhou Y. H., Yu J. Q. 2012. Hydrogen peroxide is involved in the cold acclimation-induced chilling tolerance of tomato plants. *Plant Physiol.* **Biochem.** 60 141–149. 10.1016/j.plaphy.2012.07.010

(Halaman ini sengaja dikosongkan)

LAMPIRAN

Lampiran 1 : Skema kerja

Pembibitan

Biji tembakau

Direndam dalam air selama 24 jam

Disiapkan media tanam (kompos, tanah, dan kokopeat) didalam potray

disemai

Disirami 1x sehari hingga tumbuh 3-4 daun

Perlakuan sebelum dan sesudah pemberian cekaman

Bibit tembakau

Dipindah kedalam media polybag dengan komposisi media yang sama

Disirami 1x sehari selama 7 hari.

Diberi paraquat dengan konsentrasi 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.005%.

Dihentikan pemberian air selama 28 hari

Diberi penyinaran dengan lampu 40 watt s⁻² selama 1 jam.

Diambil sampel daun sebanyak 2 gr untuk uji klorofil, asam askorbat, kandungan air relatif, dan malondialdehid

Di hari ke 28 diambil sampel daun lagi sebanyak 2 gr untuk uji klorofil, asam askorbat, kandungan air relatif, dan

Malondialdehyde

Daun tembakau

Diambil sampel daun dan ditimbang dengan berat 0.5 g

Dihaluskan dan dihomogenisasi dengan 5ml trikloroasetat

Disentrifugasi pada 2000 x g selama 15 menit

Supernatan dicampur dengan 2ml asam thiobarbituric (TBA)

Diinkubasi pada 100°C selama 100 menit dan didinginkan

Disentrifugasi pada 2000 x g selama 5 menit

Di ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 450, 532, dan 600

Asam askorbat

Daun tembakau

Diambil sampel daun sebanyak 2 gr

Ditambah aquades hingga 20ml, dan diambil filtrate sebanyak 5ml

Ditambah 2ml indicator amilum 1%

Dititrasi menggunakan iodine 0,01 N hingga terjadi perubahan warna menjadi biru keunguan

Klorofil

Daun tembakau

Diambil sampel daun sebanyak 0.5 gr

Digerus menggunakan cawan porselin

Ditambah dengan pelarut (etanol 96%) sebanyak 100 ml

Diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) = 649 dan 665 nm

Kandungan air relatif

Daun tembakau

Dipilih daun tembakau secara acak

Dipotong bagian ujung atas dan bawah daun

Dipindah dengan cepat kedalam tabung yang telah ditimbang

Didinginkan pada suhu 10 – 15°C tetapi tidak beku

Ditimbang semua tabung (tubeW+FW)

Ditambahkan 1 cm air kedalam tabung

Tempatkan tabung sampel di kulkas (pada suhu 4 ° C dalam

Diambil sampel daun dari tabung, dengan cepat dan hati-hati dikeringkan pada handuk kertas.

Ditimbang (TW : Turgid weight)

Ditempatkan dalam amplop berlabel dan keringkan pada suhu 70 ° C selama 24 jam.

Dihitung menggunakan rumus [kandungan air relatif (%) = $((FW-DW) / (TW-DW)) \times 100$]

Lampiran 2 : Tabel hasil uji**Klorofil**

Perlakuan	klorofil total mg/l	
	1 hari cekaman	28 hari cekaman
0.0005	21.29 ± 3.1	13.44 ± 2.37
0.001	29.06 ± 1.89	26.94 ± 3.48
0.0025	18.58 ± 3.46	30.58 ± 4.61
0.005	25.56 ± 6.17	21.22 ± 3.09
kontrol	26.84 ± 6.07	10.76 ± 3.27
kontrol +	6.96 ± 6.96	23.89 ± 9.15

Kandungan air relatif

Perlakuan	Pra				
	Pengulangan ke-			mean	stdev
	1	2	3		
0.0005	74	69	71	71.3	2.517
0.001	90	96	76	87.3	10.263
0.0025	81	81	83	81.7	1.155
0.005	53	84	78	71.7	16.442
kontrol	83	66	53	67.3	15.044
kontrol +	90	90	89	89.7	0.577

Malondialdehid

Perlakuan	Pra				Pasca			
	Pengulangan ke-		mean	stdev	Pengulangan ke-		mean	stdev
	1	2			1	2		
0.0005	0.943	0.982	0.9625	0.028	1.122	1.058	1.0900	0.0453
0.001	1.073	0.997	1.0350	0.054	1.626	1.918	1.7720	0.2065
0.0025	0.835	0.829	0.8320	0.004	1.626	1.918	1.7720	0.2065
0.005	0.633	0.657	0.6450	0.017	1.242	1.294	1.2680	0.0368
kontrol	1.396	0.48	0.9380	0.648	1.054	1.353	1.2035	0.2114
kontrol +	0.94	0.911	0.9255	0.021	1.115	1.716	1.4155	0.4250

Asam askorbat

Perlakuan	Pra						Pasca					
	Pengulangan ke-			mean	stdev	Pengulangan ke-			mean	stdev		
	1	2	3			1	2	3				
0.0005	0.0704	0.0805	0.0704	0.0738	0.2459	0.006	0.0905	0.121	0.1006	0.1040	0.3468	0.0155
0.001	0.0503	0.0603	0.1006	0.0704	0.2347	0.027	0.0905	0.131	0.111	0.1108	0.3694	0.0203
0.0025	0.0704	0.0704	0.0805	0.0738	0.2459	0.006	0.0805	0.1006	0.0905	0.0905	0.3018	0.0101
0.005	0.0905	0.0805	0.1207	0.0972	0.3241	0.021	0.0905	0.0805	0.0905	0.0872	0.2906	0.0058
kontrol	0.0704	0.0805	0.0704	0.0738	0.2459	0.006	0.0805	0.0805	0.0805	0.0805	0.2683	0.0000
kontrol +	0.0905	0.0704	0.0805	0.0805	0.2682	0.010	0.0905	0.0805	0.0805	0.0838	0.2794	0.0058

Lampiran 3 : Hasil uji ANOVA One way

Klorofil

Hari ke-1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	230.492	5	46.098	2.136	.131
Within Groups	259.019	12	21.585		
Total	489.511	17			

Hari ke- 28

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	892.320	5	178.464	7.486	.002
Within Groups	286.073	12	23.839		
Total	1178.393	17			

Multiple Comparisons

KLOROFIL

LSD hari ke 28

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
0.0005	PERLA KUAN	PERLA KUAN					
	0.001	-13.49481*	3.98660	.005	-22.1809	-4.8088	
	0.0025	-17.14147*	3.98660	.001	-25.8275	-8.4554	
	0.005	-7.77814	3.98660	.075	-16.4642	.9079	
	kontrol +	kontrol	-10.45147*	3.98660	.022	-19.1375	-1.7654
	kontrol	2.68519	3.98660	.513	-6.0009	11.3712	
0.001	0.0005	13.49481*	3.98660	.005	4.8088	22.1809	
	0.0025	-3.64667	3.98660	.378	-12.3327	5.0394	
	0.005	5.71667	3.98660	.177	-2.9694	14.4027	
	kontrol +	kontrol	3.04333	3.98660	.460	-5.6427	11.7294
	kontrol	16.18000*	3.98660	.002	7.4940	24.8660	
0.0025	0.0005	17.14147*	3.98660	.001	8.4554	25.8275	
	0.001	3.64667	3.98660	.378	-5.0394	12.3327	
	0.005	9.36333*	3.98660	.037	.6773	18.0494	
	kontrol +	kontrol	6.69000	3.98660	.119	-1.9960	15.3760

	kontrol	19.82667*	3.98660	.000	11.1406	28.5127
0.005	0.0005	7.77814	3.98660	.075	-.9079	16.4642
	0.001	-5.71667	3.98660	.177	-14.4027	2.9694
	0.0025	-9.36333*	3.98660	.037	-18.0494	-.6773
	kontrol +	-2.67333	3.98660	.515	-11.3594	6.0127
	kontrol	10.46333*	3.98660	.022	1.7773	19.1494
kontrol	0.0005	10.45147*	3.98660	.022	1.7654	19.1375
+	0.001	-3.04333	3.98660	.460	-11.7294	5.6427
	0.0025	-6.69000	3.98660	.119	-15.3760	1.9960
	0.005	2.67333	3.98660	.515	-6.0127	11.3594
	kontrol	13.13667*	3.98660	.006	4.4506	21.8227
kontrol	0.0005	-2.68519	3.98660	.513	-11.3712	6.0009
	0.001	-16.18000*	3.98660	.002	-24.8660	-7.4940
	0.0025	-19.82667*	3.98660	.000	-28.5127	-11.1406
	0.005	-10.46333*	3.98660	.022	-19.1494	-1.7773
	kontrol +	-13.13667*	3.98660	.006	-21.8227	-4.4506

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Asam askorbat

Hari ke-1

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.001 ^a	5	.000	1.299	.327
Intercept	.110	1	.110	489.616	.000
PERLAKUAN	.001	5	.000	1.299	.327
Error	.003	12	.000		
Total	.114	18			
Corrected Total	.004	17			

a. R Squared = .351 (Adjusted R Squared = .081)

Hari ke-28

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.002 ^a	5	.000	3.164	.047
Intercept	.155	1	.155	1.136E3	.000
PERLAKUAN	.002	5	.000	3.164	.047
Error	.002	12	.000		
Total	.159	18			

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.002 ^a	5	.000	3.164	.047
Intercept	.155	1	.155	1.136E3	.000
PERLAKUAN	.002	5	.000	3.164	.047
Error	.002	12	.000		
Total	.159	18			
Corrected Total	.004	17			

a. R Squared = .569 (Adjusted R Squared = .389)

Uji LSD hari ke-28

Asam askorbat

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
0.0005	PERLA KUAN	0.001	-0.0068	.00954	.490	-0.0276	.0140
		0.0025	.0135	.00954	.182	-0.0073	.0343
		0.005	.0169	.00954	.102	-0.0039	.0377
		kontrol +	.0202	.00954	.056	-0.0006	.0410
		kontrol	.0235*	.00954	.030	.0027	.0443
0.001	0.0005	.0068	.00954	.490	-0.140	.0276	
	0.0025	.0203	.00954	.055	-0.0005	.0411	
	0.005	.0237*	.00954	.029	.0029	.0445	
	kontrol +	.0270*	.00954	.015	.0062	.0478	
	kontrol	.0303*	.00954	.008	.0095	.0511	
0.0025	0.0005	-0.0135	.00954	.182	-0.0343	.0073	
	0.001	-0.0203	.00954	.055	-0.0411	.0005	
	0.005	.0034	.00954	.730	-0.0174	.0242	
	kontrol +	.0067	.00954	.496	-0.0141	.0275	
	kontrol	.0100	.00954	.314	-0.0108	.0308	

0.005	0.0005	-.0169	.00954	.102	-.0377	.0039
	0.001	-.0237*	.00954	.029	-.0445	-.0029
	0.0025	-.0034	.00954	.730	-.0242	.0174
	kontrol	.0033	.00954	.733	-.0175	.0241
	+					
	kontrol	.0067	.00954	.498	-.0141	.0275
kontrol	0.0005	-.0202	.00954	.056	-.0410	.0006
+	0.001	-.0270*	.00954	.015	-.0478	-.0062
	0.0025	-.0067	.00954	.496	-.0275	.0141
	0.005	-.0033	.00954	.733	-.0241	.0175
	kontrol	.0033	.00954	.733	-.0175	.0241
kontrol	0.0005	-.0235*	.00954	.030	-.0443	-.0027
	0.001	-.0303*	.00954	.008	-.0511	-.0095
	0.0025	-.0100	.00954	.314	-.0308	.0108
	0.005	-.0067	.00954	.498	-.0275	.0141
	kontrol	-.0033	.00954	.733	-.0241	.0175
	+					

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .000.

Malondialdehid

Hari ke- 1

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.186 ^a	5	.037	.528	.750
Intercept	9.498	1	9.498	134.438	.000
PERLAKUAN	.186	5	.037	.528	.750
Error	.424	6	.071		
Total	10.108	12			
Corrected Total	.610	11			

a. R Squared = .305 (Adjusted R Squared = -.273)

Hari ke-28

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.853 ^a	5	.171	3.262	.091
Intercept	24.202	1	24.202	462.519	.000
PERLAKUAN	.853	5	.171	3.262	.091
Error	.314	6	.052		
Total	25.370	12			

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.853 ^a	5	.171	3.262	.091
Intercept	24.202	1	24.202	462.519	.000
PERLAKUAN	.853	5	.171	3.262	.091
Error	.314	6	.052		
Total	25.370	12			
Corrected Total	1.167	11			

a. R Squared = .731 (Adjusted R Squared = .507)

Kandungan air relatif

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1304.500 ^a	5	260.900	2.566	.084
Intercept	109980.500	1	109980.500	1.082E3	.000
PERLAKUAN	1304.500	5	260.900	2.566	.084
Error	1220.000	12	101.667		
Total	112505.000	18			
Corrected Total	2524.500	17			

a. R Squared = .517 (Adjusted R Squared = .315)

Lampiran 4 : Dokumentasi penelitian

Pra-perlakuan



tanaman berumur 7 hst sebelum dilakukan perlakuan



Pemberian pre-treatment paraquat

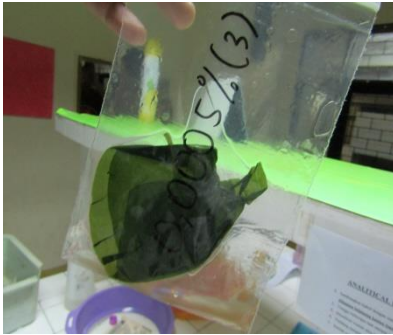


Penyinaran menggunakan lampu 40 watt



H+1 pemberian perlakuan

Uji klorofil



Sampel daun diambil



Digerus sampel daun dan ditambah dengan pelarut etanol



Filtrat dimasukkan kedalam kuvet

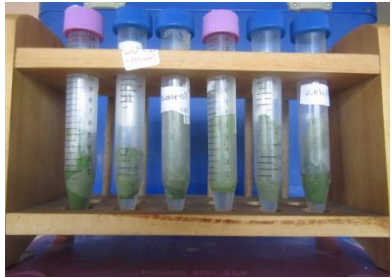


Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer

Kandungan air relatif



Pemotongan sampel daun



Daun yang telah dipotong dimasukkan dalam tube



Sampel didinginkan didalam lemari es



Penimbangan sampel

Malondialdehid



Sampel daun yang telah dihaluskan + TCA



Sampel dipanaskan



Sampel didinginkan



Di ukur menggunakan spektrofotometri

