



**RESPON PERTUMBUHAN DAN EKSPRESI GEN  
ASCORBATE PEROXIDASE PADA UMUR BIBIT MELINJO  
YANG BERBEDA SETELAH CEKAMAN KEKERINGAN**

**SKRIPSI**

Oleh :

**Laras Sekar Arum  
NIM. 101510501140**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**RESPON PERTUMBUHAN DAN EKSPRESI GEN  
ASCORBATE PEROXIDASE PADA UMUR BIBIT MELINJO  
YANG BERBEDA SETELAH CEKAMAN KEKERINGAN**

**SKRIPSI**

Diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan  
Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi (S1)  
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh :  
**Laras Sekar Arum**  
**NIM. 101510501140**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

### **PERSEMBAHAN**

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, skripsi ini saya persembahkan kepada

1. Kedua orangtua tercinta, Ibunda Nurul Hidayati dan Ayahanda Gondo Sukmono, terimakasih tiada tara atas segala pengorbanan, kasih sayang, doa, dan dukungan yang tiada batasnya. Kakak dan adik tercinta yang dengan penuh kasih sayang mendampingi segala perjuangan yang dilakukan.
2. Para guru sejak Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi telah mendidik dan memberikan ilmunya.
3. Almamater Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

**MOTTO**

**Tiada perjuangan yang akan menjadi sia-sia dan tiada keberhasilan tanpa diiringi ridho dan do'a tulus Orang Tua serta ridho Allah SWT.**

**Keberhasilan yang kan diraih akan mengikuti besarnya usaha, pengorbanan, dan tantangan yang dihadapi**

**Bismillahirrahmanirrahiim, siapa yang bersungguh-sungguh akan mendapatkan kesuksesan. Pantang menyerah dan terus melangkah.**

**(Penulis)**

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Laras Sekar Arum

NIM : 101510501140

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Respon Pertumbuhan dan Ekspresi Gen Ascorbate Peroxidase pada Umur Bibit Melinjo yang Berbeda Setelah Cekaman Kekeringan”** adalah benar-benar hasil karya sendiri. Kecuali jika pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan sebelumnya belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isi sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 April 2015

Yang Menyatakan,

Laras Sekar Arum  
NIM. 101510501140

**SKRIPSI**

**RESPON PERTUMBUHAN DAN EKSPRESI GEN  
ASCORBATE PEROXIDASE PADA UMUR BIBIT MELINJO  
YANG BERBEDA SETELAH CEKAMAN KEKERINGAN**

Oleh:

LARAS SEKAR ARUM  
NIM. 101510501140

Pembimbing:

Pembimbing Utama : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D  
NIP. 197008101998031001

Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Sholeh Avivi, M.Si  
NIP. 196907212000121002

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Respon Pertumbuhan dan Ekspresi Gen Ascorbate Peroxidase Pada Umur Bibit Melinjo yang Berbeda Setelah Cekaman Kekeringan**”, telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada:

Hari, tanggal : Kamis, 30 April 2015

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

**Dosen Penguji,**

**Dr. Ir. Miswar, M.Si**  
**NIP. 196410191990021002**

**Dosen Pembimbing Utama,**

**Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D**  
**NIP. 197008101998031001**

**Dosen Pembimbing Anggota,**

**Dr. Ir. Sholeh Avivi, M.Si**  
**NIP. 196907212000121002**

**Mengesahkan**

**Dekan,**

**Dr. Ir. Jani Januar, MT.**  
**NIP. 195901021988031002**

## RINGKASAN

**Respon Pertumbuhan dan Ekspresi Gen Ascorbate Peroxidase Pada Umur Bibit Melinjo yang Berbeda Setelah Cekaman Kekeringan;** Laras Sekar Arum, 101510501140; 2014; 51 Halaman; Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Kekeringan merupakan salah satu faktor utama yang dapat menekan pertumbuhan dan hasil, dengan mengakumulasi senyawa radikal bebas pada tanaman. Tanaman dapat membentuk beberapa mekanisme pertahanan terhadap cekaman kekeringan, dengan produksi senyawa antioksidan. Salah satu antioksidan yang berperan penting adalah enzim ascorbate peroxidase (APX). Ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan juga bergantung tahap pertumbuhan tanaman. Adanya cekaman kekeringan pada tahap pertumbuhan yang lebih tinggi diduga mampu meningkatkan ekspresi gen APX. Ekspresi gen APX yang teridentifikasi dapat dimanfaatkan sebagai bahan genetik untuk menghasilkan tanaman toleran kekeringan.

Penelitian ini dilakukan dengan perlakuan cekaman kekeringan menggunakan polietilena glikol (PEG) 15%, pada beberapa umur bibit melinjo, 1 bulan (U1), 2 bulan (U2), 3 bulan (U3), dan 4 bulan (U4). Parameter yang diamati adalah tinggi tanaman, berat basah total, rasio akar:tajuk, luas daun, kandungan klorofil total, pita DNA APX, disertai dengan aktivitas enzim APX. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor, Data hasil Percobaan dianalisis menggunakan *analysis of variant* (ANOVA) dan jika terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf 5%. Hasil percobaan menunjukkan bahwa pertumbuhan bibit melinjo cenderung lebih rendah pada perlakuan PEG 15% namun mengalami peningkatan pada umur yang lebih tinggi. Sedangkan ekspresi gen APX pada PEG 15% lebih besar, disertai dengan peningkatan aktivitas enzim APX sebesar 96.2%. Bibit umur 4 bulan cenderung memiliki kemampuan ketahanan yang lebih besar berdasarkan responnya terhadap ekspresi dan aktivitas enzim APX, serta beberapa parameter pertumbuhan bibit dengan nilai yang lebih besar.

## SUMMARY

**Growth Response and Ascorbate Peroxidase Gene Expression of Melinjo (*Gnetum Gnemon L.*) Seedling in Different Ages Under Drought Stress;** Laras Sekar Arum, 101510501140; 2014; 51 Pages; Study Program of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Drought is one of the major factors that influence the growth and crop yield by accumulation of free radical compounds in plants. Plants can develop several defense mechanisms to drought stress, such as production of antioxidant compounds. One that is important as antioxidant compound is APX, which can be analyzed by expression of APX gene. Plant resistance to drought stress also depends on the stages of plant growth. The existence of drought stress on a higher growth stage could increase the expression and enzyme activity of APX. Identified APX gene expression can also be used as genetic material to produce drought-tolerant plants.

This research was conducted with drought stress treatment with 15% PEG on several melinjo seedlings, which indicated has a high antioxidant compounds to scavenge free radicals in plants. Parameters observed in plant height, total fresh weight, ratio of root : shoot, leaf area, total chlorophyll content, DNA bands of APX, and APX enzyme activity as a product of APX gene expression. The research used completely randomized design, and the results were analyzed by analysis of variance with 2 factors that followed by Duncan test in  $\alpha=5\%$ . The result showed that most of the growth characters and total chlorophyll content were reduced in 15% PEG treatment, but increased at higher seedling age. While the APX gene expression and enzyme activity at 15% PEG were increased about 96.2%. Melinjo seedlings on 4 months old were likely have a greater resistance capability compared with other seedling age, judging by his response to the gene expression of APX, as well as some growth parameters of seedlings with greater value.

## PRAKATA

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis (Skripsi) yang berjudul **Respon Pertumbuhan dan Ekspresi Gen Ascorbate Peroxidase Pada Umur Bibit Melinjo yang Berbeda Setelah Cekaman Kekeringan** sebagai tugas akhir di Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu menyelesaikan tulisan ini terutama kepada:

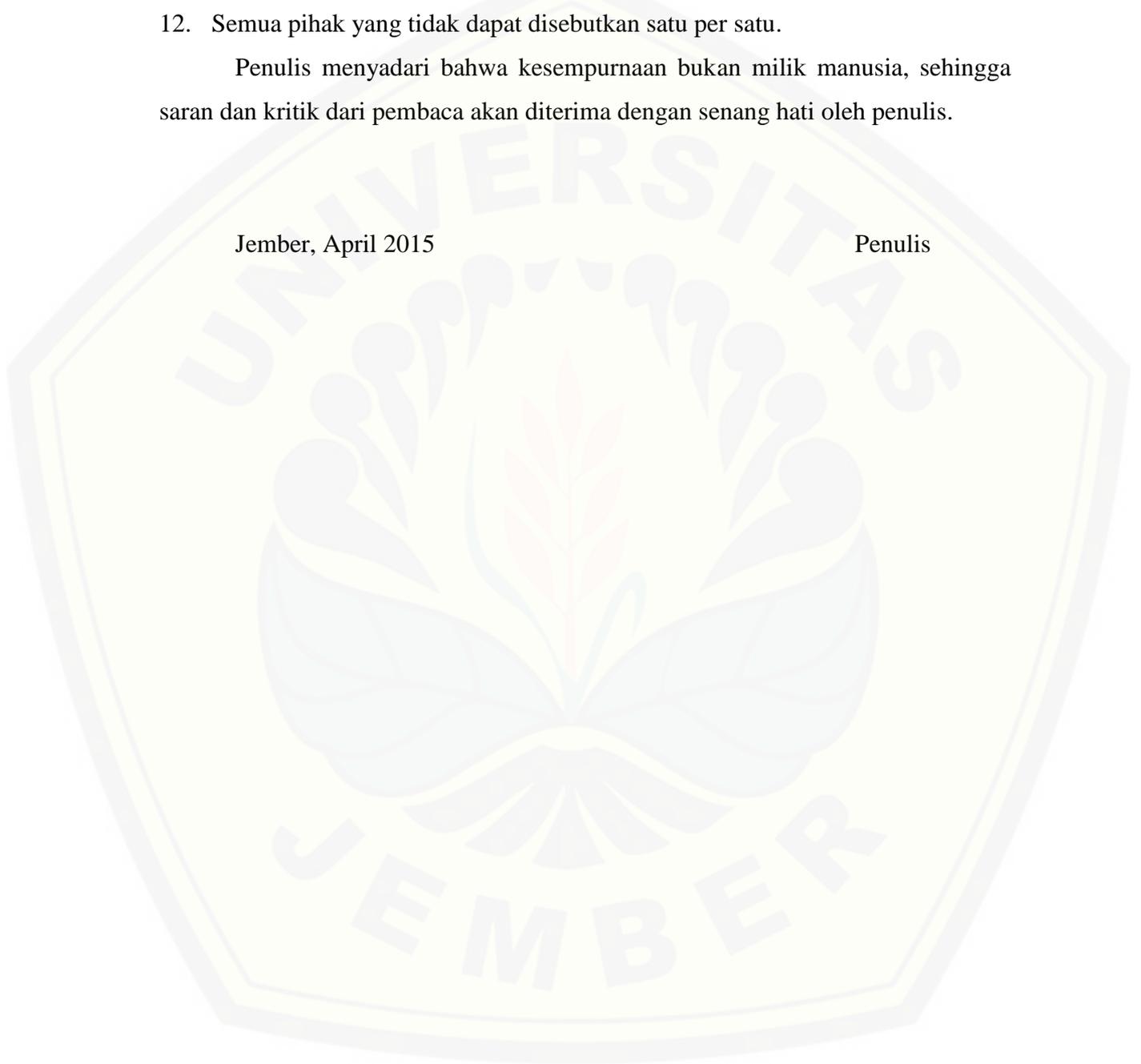
1. Dr. Ir. Jani Januar, MT. Selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC Selaku Keta Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
3. Prof. Tri Agus Siswoyo, Sp., M.Agr., Ph.D. Selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, serta masukan dalam penyelesaian skripsi ini.
4. Dr. Ir. Sholeh Avivi, M.Si. Selaku Dosen Pembimbing Anggota dan Dr. Ir. Miswar, M.Si sebagai dosen penguji skripsi yang telah memberikan bimbingan dan arahan bagi penulis.
5. Orang tua beserta segenap keluarga atas dukungan dan doa restunya selama ini
6. Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan selama masa perkuliahan.
7. Rekan-rekan dan staf di Laboratorium Analisis Tanaman yang telah membantu dan memberi dukungan, serta motivasi selama pelaksanaan dan penyelesaian karya tulis ilmiah ini.
8. Rekan-rekan mahasiswa dan staf CDAST Universitas Jember yang telah membantu dan mendukung selama pelaksanaan skripsi.
9. Tim asisten dan dosen Laboratorium Teknologi Benih yang juga turut memberi dukungan.

10. Para sahabat, yang banyak memberi semangat serta motivasi untuk menyelesaikan karya tulis ilmiah ini.
11. Rekan-rekan *D'Acid* yang bersama berjuang menyelesaikan studi di Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa kesempurnaan bukan milik manusia, sehingga saran dan kritik dari pembaca akan diterima dengan senang hati oleh penulis.

Jember, April 2015

Penulis



DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING .....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>ix</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan .....	2
1.4 Manfaat .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Cekaman Kekeringan .....	4
2.2 Polietilena Glikol (PEG) .....	5
2.3 Ekspresi Gen .....	5
2.4 Ascorbate Peroxidase (APX) .....	6
2.5 Tanaman Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.) .....	8
2.6 Hipotesis .....	9
<b>BAB 3. METODOLOGI.....</b>	<b>10</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	10
3.2 Bahan dan Alat .....	10
3.2.1 Bahan .....	10

3.2.2 Alat .....	10
3.3 Rancangan Percobaan .....	10
3.4 Pelaksanaan Percobaan .....	11
3.4.1 Pembuatan Media Tanam .....	11
3.4.2 Penanaman Bibit dan Aplikasi PEG .....	11
3.4.3 Isolasi RNA .....	11
3.4.4 Metode <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	12
3.4.5 Elektroforesis DNA .....	13
3.4.6 Analisis Aktivitas Enzim APX .....	13
3.4.6 Analisis Kandungan Klorofil .....	13
3.5 Parameter .....	14
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>15</b>
4.1 Nilai F-Hitung Beberapa Parameter Percobaan .....	15
4.2 Pengaruh Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Ekspresi Gen APX pada Bibit Melinjo.....	16
4.3 Pengaruh Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Aktivitas Enzim APX pada Bibit Melinjo.....	19
4.4 Interaksi Antara Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Kandungan Klorofil Total Bibit Melinjo .....	21
4.5 Pengaruh Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Panjang Akar Bibit Melinjo .....	23
4.6 Pengaruh Beda Umur Bibit Melinjo terhadap Berat Basah Tanaman .....	24
4.7 Pengaruh Beda Umur terhadap Rasio Akar:Tajuk Bibit Melinjo .....	26
4.8 Pengaruh Perlakuan PEG terhadap Luas Daun Bibit Melinjo .....	28
4.9 Interaksi Antara Perlakuan PEG dan Beda Umur Bibit Melinjo terhadap Tinggi Tanaman .....	29
4.10 Pembahasan Umum.....	30
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>34</b>
5.1 Kesimpulan .....	34
5.2 Saran .....	34

<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>35</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>41</b>



**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
2.5	Skema Mekanisme Antioksidan terhadap Cekaman .....	7
4.2	Hasil Elektroforesis DNA .....	16
4.3.1	Pengaruh PEG terhadap Aktivitas Enzim APX .....	19
4.3.2	Pengaruh Beda Umur terhadap Aktivitas Enzim APX .....	20
4.7	Morfologi Akar pada Masing-Masing Perlakuan .....	27

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
4.1	Nilai F-Hitung Beberapa Parameter Percobaan .....	14
4.2	Konsentrasi mRNA Hasil Isolasi . .....	17
4.4	Interaksi Antara Perlakuan PEG dan Beda Umur Bibit Melinjo terhadap Kandungan Klorofil Total .....	21
4.5	Pengaruh Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Panjang Akar Bibit Melinjo .....	23
4.6	Pengaruh Beda Umur terhadap Berat Basah Total Bibit Melinjo.....	25
4.7	Pengaruh Beda Umur terhadap Rasio Akar:Tajuk Bibit Melinjo.....	26
4.8	Pengaruh Perlakuan PEG terhadap Luas Daun Bibit Melinjo .....	28
4.9	Interaksi Perlakuan PEG dan Beda Umur Bibit Melinjo terhadap Tinggi Tanaman .....	29

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1.	Dokumentasi Penelitian .....	41
Lampiran 2.	Analisis Aktivitas Enzim APX .....	42
Lampiran 3.	Analisis Kandungan Klorofil Total .....	44
Lampiran 4.	Tinggi Tanaman Setelah Perlakuan .....	46
Lampiran 5.	Luas Daun Bibit Melinjo .....	48
Lampiran 6.	Berat Basah Bibit Melinjo .....	49
Lampiran 7.	Rasio Akar:Tajuk Bibit Melinjo .....	50
Lampiran 8.	Panjang Akar Bibit Melinjo.....	51

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Cekaman kekeringan pada tanaman terjadi ketika air di dalam tanah atau media tanam kurang tersedia, sehingga kebutuhan air untuk tumbuh dan berkembang belum tercukupi. Cekaman kekeringan dapat meningkatkan konsentrasi *reactive oxygen species* (ROS) dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada level seluler (Yoshimura *et al.*, 2000). Astuti (2008) menyatakan terjadinya akumulasi ROS dapat menghancurkan makromolekul penyusun membran organel atau sel, hal ini dapat mengakibatkan kematian sel. Kerusakan sel tersebut dapat mengakibatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman kurang optimal, sehingga dapat menurunkan produktivitasnya.

Tanaman akan membentuk mekanisme adaptasi tertentu, salah satunya dengan mengekspresikan gen yang spesifik, yang dapat berperan langsung dalam meminimalisir berbagai kerusakan akibat peningkatan akumulasi ROS. Gen yang terekspresi tersebut dapat membentuk suatu produk, salah satunya adalah antioksidan yang dapat berperan dalam mencegah kerusakan sel dan menjaga keseimbangan metabolisme seluler (Rachhi, 2013). Yoshimura *et al.*, (2000) menyatakan bahwa antioksidan yang memiliki peran utama dalam menetralkan toksisitas ROS dalam bentuk  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  adalah ascorbate peroxidase (APX).

Melinjo merupakan salah satu tanaman model yang tepat untuk melakukan percobaan tersebut. Manner and Craig (2006) menyatakan bahwa tanaman melinjo memiliki sifat toleran terhadap cekaman kekeringan. Adanya sifat tersebut diharapkan dapat menunjukkan kemampuan toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan yang di dalamnya terkandung gen APX. Selain itu, tanaman ini juga berpotensi sebagai sumber bahan genetik untuk merakit tanaman tahan kekeringan. Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) juga merupakan tanaman berbiologi terbuka yang berpotensi untuk dikembangkan secara komersial dikarenakan daun,

bunga, biji, dan kulit biji melinjo dapat digunakan sebagai makanan olahan dan bahan nutrasetikal yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Biji melinjo mengandung 9-10% protein dengan aktivitas antioksidan yang cukup tinggi, sehingga dapat berpotensi sebagai sumber bahan alami untuk menangkal radikal bebas dari lingkungan (Siswoyo *et al.*, 2011).

Oleh karena itu perlu dilakukan suatu percobaan untuk mengetahui kemampuan toleransi tanaman melinjo terhadap cekaman kekeringan dengan mengidentifikasi pertumbuhan dan ekspresi gen APX pada umur tanaman yang berbeda. Hal ini berkaitan dengan Caverzan *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa ekspresi gen APX pada saat transkripsi di berbagai jaringan tanaman juga bergantung pada tahap pertumbuhan dan perkembangan tanaman tersebut. Dengan demikian juga dapat diketahui respon bibit melinjo dengan cekaman kekeringan pada tahap pertumbuhan yang berbeda. Adapun simulasi cekaman kekeringan ini dilakukan dengan pengaplikasian senyawa osmotikum, polietilena glikol (PEG), yang dapat menurunkan serapan air pada akar dari dalam media (Dodd and Danovan, 1999).

### **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana respon pertumbuhan maupun ekspresi gen APX bibit melinjo terhadap cekaman kekeringan menggunakan PEG?
2. Bagaimana respon pertumbuhan dan ekspresi gen APX bibit melinjo dengan umur yang berbeda?
3. Bagaimana respon pertumbuhan maupun ekspresi gen APX bibit melinjo terhadap interaksi umur bibit yang berbeda dan cekaman kekeringan menggunakan PEG?

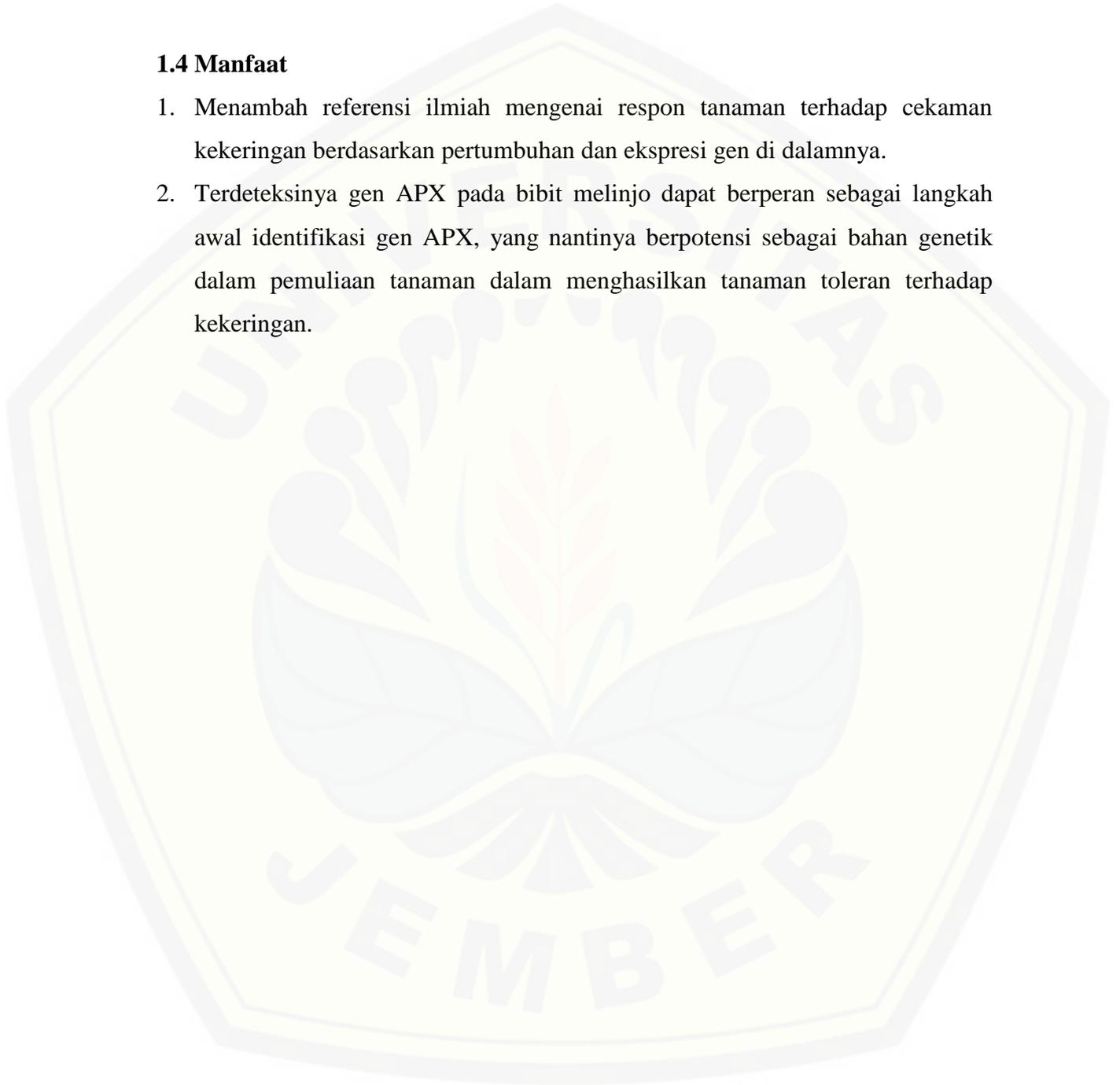
### **1.3 Tujuan**

1. Mengetahui respon pertumbuhan dan ekspresi gen APX bibit melinjo terhadap cekaman kekeringan menggunakan PEG.
2. Mengetahui respon pertumbuhan dan ekspresi gen APX bibit melinjo pada umur yang berbeda.

3. Mengetahui respon pertumbuhan maupun ekspresi gen APX bibit melinjo terhadap interaksi umur bibit yang berbeda dan cekaman kekeringan menggunakan PEG.

#### **1.4 Manfaat**

1. Menambah referensi ilmiah mengenai respon tanaman terhadap cekaman kekeringan berdasarkan pertumbuhan dan ekspresi gen di dalamnya.
2. Terdeteksinya gen APX pada bibit melinjo dapat berperan sebagai langkah awal identifikasi gen APX, yang nantinya berpotensi sebagai bahan genetik dalam pemuliaan tanaman dalam menghasilkan tanaman toleran terhadap kekeringan.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Cekaman Kekeringan

Cekaman kekeringan pada tanaman dapat disebabkan oleh kekurangan suplai air di daerah perakaran dan permintaan air yang berlebihan pada daun akibat transpirasi yang lebih tinggi. Tanaman yang mengalami kekeringan dapat memperbaiki status air dengan mengubah distribusi asimilat baru untuk mendukung pertumbuhan akar daripada tajuk sehingga meningkatkan kapasitas akar untuk menyerap air. Cekaman kekeringan juga dapat mempengaruhi reaksi biokimia fotosintesis sehingga laju fotosintesis menurun, salah satu yang paling sensitif adalah biosintesis klorofil (Ai, 2011).

Menurut Nurhayati (2006), respon tanaman terhadap defisiensi air bergantung pada tingkat dan lama stress, genotipe, serta tahap pertumbuhan. Pada tingkat sel dapat menginduksi gen yang mengalami cekaman defisiensi air sehingga mengakibatkan perubahan ekspresi gen tersebut. Bray (1993) menyatakan bahwa respon tanaman terhadap defisiensi air diawali dengan adanya sinyal transduksi, kemudian akan mempengaruhi perubahan tingkat sel, fisiologis, dan tingkat pertumbuhan tanaman.

Cekaman kekeringan dapat menginduksi terjadinya akumulasi ROS yang menyebabkan gangguan oksidatif pada protein, lemak, dan asam lemak. Salah satu mekanisme tanaman menghadapi cekaman tersebut adalah dengan membentuk reaksi antioksidatif dengan meningkatkan aktivitas antioksidan yang dapat berperan dalam mekanisme toleran terhadap cekaman kekeringan yang dialami, dengan cara menghilangkan toksisitas dari ROS. Hal tersebut dapat terjadi dengan adanya aktivasi ekspresi gen tertentu. Identifikasi terhadap ekspresi gen tersebut menjadi suatu hal yang penting agar dapat menjelaskan mekanisme adaptasi molekuler pada tanaman terhadap cekaman kekeringan (Jiang, 2010).

## 2.2 Polietilena Glikol (PEG)

Percobaan lapang mengenai cekaman kekeringan cukup sulit untuk dilakukan berkaitan dengan kondisi lingkungan yang kurang signifikan, juga kemungkinan adanya interaksi antara kekeringan dengan cekaman abiotik lainnya. Salah satu alternatif untuk menginduksi cekaman kekeringan yaitu larutan PEG juga dapat dilakukan untuk skrining plasma nutfah. PEG 6000 merupakan larutan non ionik yang tidak dapat melakukan penetrasi langsung pada jaringan tanaman (Bibi *et al.*, 2012). Larutan ini dapat menghambat penyerapan air pada akar berkaitan dengan adanya reduksi dari potensial osmotik (Dodd and Donovan, 1999).

Senyawa PEG bersifat osmotik dan dapat larut dalam air sehingga mampu menurunkan potensial air dalam media secara homogen. PEG memiliki sifat yang mudah larut di dalam air yang nantinya bereaksi dan mengakibatkan penurunan potensial air. Semakin tinggi konsentrasi PEG dalam media menyebabkan terhambatnya proses osmosis dalam sel sehingga menghambat masuknya air ke dalam sel (Sutjahjo *et al.*, 2007).

Senyawa PEG 6000 memiliki kemampuan kerja yang lebih baik dibanding PEG dengan berat molekul yang lebih rendah (Michel and Kaufman 1973). Menurut Efendi *et al.* (2010), penyiraman larutan PEG 10% ke dalam media tanam merupakan kondisi efektif untuk melihat toleransi genotipe jagung terhadap cekaman kekeringan. Tingkat toleransi terhadap cekaman kekeringan pada setiap tanaman dapat berbeda-beda, hal ini berkaitan dengan masing-masing karakter yang dimilikinya.

## 2.3 Ekspresi Gen

Ekspresi suatu gen ditandai dengan adanya proses transkripsi yang merupakan tahap sintesis mRNA dari untai DNA yang mengkode protein. Proses transkripsi tersebut diikuti dengan translasi yang merupakan tahap sintesis protein pada ribosom. Ekspresi gen pada eukariot dapat memicu diferensiasi sel dan jaringan yang dapat berkaitan dengan adanya kemungkinan perbedaan siklus hidup pada hewan dan tumbuhan (Lodish *et al.*, 2004).

Ekspresi gen juga berkaitan dengan tingginya faktor transkripsi di dalam sel yang terinduksi oleh pengaruh lingkungan. Faktor transkripsi berperan penting dalam meregulasi ekspresi gen pada tanaman terhadap stres. Regulasi terjadi dengan adanya modifikasi pada level kromatin atau mRNA, sehingga dapat menimbulkan ekspresi gen tertentu. Ekspresi gen terhadap cekaman cekaman kekeringan dapat terlihat melalui morfologi dan fisiologis tanaman (Bhargava and Kshitija, 2013).

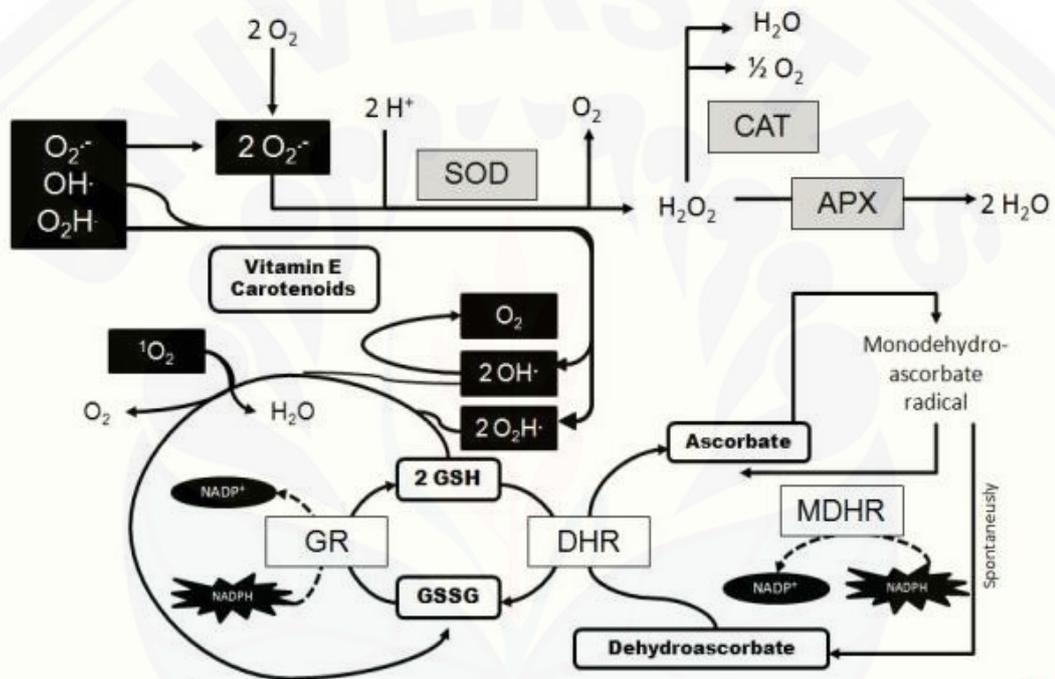
Ekspresi gen dapat dideteksi melalui mRNA karena jumlahnya dapat berubah-ubah sesuai dengan kondisi lingkungan dibandingkan DNA yang jumlahnya relatif stabil (Alberts *et al.*, 2008). Selanjutnya, mRNA dikonversi menjadi *complementary DNA* (cDNA) dengan menggunakan *reverse transcriptase*. Selanjutnya cDNA yang terbentuk diamplifikasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) yang merupakan teknik amplifikasi DNA sesuai dengan sekuen DNA target spesifik (Ausubel *et al.*, 2003).

#### **2.4 Ascorbate Peroxidase (APX)**

APX merupakan salah satu produk seluler di dalam tanaman yang berperan penting sebagai antioksidan. Ekspresi gen APX bisa diaktifkan melalui faktor-faktor tertentu seperti serangan patogen, perlukaan tanaman, radiasi UVB, defisiensi air, cekaman garam, suhu lingkungan yang terlalu tinggi maupun terlalu rendah, polusi di atmosfer, kelebihan kandungan logam, defisiensi beberapa kandungan mineral, dan akumulasi herbisida (Dabrowska *et al.*, 2007).

Caverzan *et al.* (2012) menyatakan bahwa beberapa isoform peroxidase APX yang berbeda dapat ditemukan di bagian sel secara terpisah, seperti pada kloroplas, mitokondria, peroksisom, dan sitosol. Respon APX akan secara langsung terjadi sebagai perlindungan sel tanaman terhadap kondisi lingkungan yang bersifat merugikan. Tanaman rekayasa yang mengandung gen APX menunjukkan perubahan pada pertumbuhan tanaman, fisiologi, dan produksi antioksidan yang berperan sebagai enzim sebagaimana dalam perkembangan tanaman normal.

Shikanai *et al.* (1998) menyatakan bahwa di dalam kloroplas, superoxide yang terbentuk pada photosistem 1 akibat rendahnya karbondioksida yang diserap, akan dikonversi menjadi hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan  $\text{O}_2$  oleh enzim superoxide dismutase (SOD), kemudian dikonversi kembali menjadi air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) oleh enzim APX. Enzim APX merupakan antioksidan yang memiliki peran utama dalam mengkatalis proses reduksi  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi  $\text{H}_2\text{O}$  dengan menggunakan ascorbate sebagai substrat yang akan berperan sebagai donor elektron (Asada, 1999). Mekanisme tersebut dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.



**Gambar 2.5.** Skema mekanisme antioksidan terhadap cekaman lingkungan

Mekanisme sistem antioksidan terhadap cekaman (**Gambar 2.5**), diawali dengan terbentuknya ROS, salah satunya adalah *superoxide radical* ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ). *Superoxide radical* tersebut kemudian dieliminasi oleh enzim superoxide dismutase (SOD), dari reaksi tersebut terbentuklah  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang kemudian dikonversi menjadi air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) oleh catalase (CAT) dan APX. Reaksi yang terjadi pada APX menghasilkan produk samping berupa monodehydroascorbate. Monodehydroascorbate direduksi oleh monodehydroascorbate reductase (MDHR) membentuk ascorbate dan bisa juga secara spontan mengalami dismutasi

membentuk dehydroascorbate yang juga akan membenruk ascorbate dengan adanya dehydroascorbate reductase (DHR) (Halliwell, 2006).

Selain APX, *catalase* (CAT) juga memiliki kemampuan mendetoksifikasi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$ . Kemampuan detoksifikasi CAT dirasa kurang efektif jika dibandingkan dengan APX, afinitasnya lebih rendah dibandingkan APX dengan nilai  $K_m$  sebesar 0.047 hingga 1.1 M (Halliwell, 1974). Sedangkan APX memiliki nilai  $K_m$  sebesar 0.003 M. Hal ini mengindikasikan bahwa enzim APX memiliki kemampuan detoksifikasi terhadap  $H_2O_2$  lebih besar dibandingkan dengan CAT (Frederick *et al.*, 2000).

Gaman (1992) menyatakan bahwa, terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, antara lain konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pengaruh pH, dan senyawa inhibitor. Semakin besar konsentrasi enzim pada konsentrasi substrat tertentu dapat meningkatkan kerja suatu enzim. Terjadinya perubahan konsentrasi substrat dengan konsentrasi enzim yang tetap juga dapat mempengaruhi kecepatan reaksi enzim. Enzim akan cenderung bereaksi secara lambat pada suhu rendah dan akan bekerja lebih cepat pada suhu yang tinggi hingga batas tertentu, jika terlalu tinggi enzim akan mengalami denaturasi yang akan mengakibatkan kecepatan reaksinya menurun. Perubahan pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim, dikarenakan pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dapat memicu terjadinya proses denaturasi yang akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim.

Ascorbate merupakan substrat yang digunakan oleh enzim APX dalam mereduksi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$ . Enzim APX sangat sensitif terhadap konsentrasi ascorbate sebagai substrat, jika konsentrasi ascorbate terlalu rendah (di bawah  $20\mu M$ ) maka APX akan menjadi tidak stabil dan mengalami penurunan aktivitas (Dabrowska *et al.*, 2007). Enzim APX stabil dengan pH optimum sebesar 7.5 (Camillo *et al.*, 2013), dengan suhu optimum sebesar  $50^\circ C$ , dan akan terhambat dengan adanya citric acid sebagai senyawa inhibitor, terutama pada konsentrasi 0.8M (Zou *et al.*, 2012). Aktivitas enzim APX juga dapat mengalami penurunan dikarenakan terjadinya penghambatan akumulasi APX pada level transkripsi (Tarantino *et al.*, 2005).

## 2.5 Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan salah satu jenis tanaman ber biji terbuka atau disebut juga *gymnospermae*. Melinjo dapat ditanam di berbagai kondisi tanah, baik tanah liat, tanah berpasir, maupun tanah kapur, dan dapat tumbuh di daerah pantai yang cenderung panas hingga di daerah pegunungan dengan ketinggian 1200 meter di atas permukaan laut (Sunanta, 1991).

Menurut Purnomosidhi *et al.* (2002), tanaman melinjo cukup mudah dibudidayakan dengan tidak membutuhkan tempat tumbuh dan kondisi tanah yang khusus untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Pupuk dasar untuk tanaman melinjo cukup dengan memberikan pupuk kandang pada masing-masing lubang tanam dan disertai dengan pemupukan susulan yang dilakukan dua kali 1 tahun sejak umur 1-11 tahun. Hasil panen melinjo dapat berupa buah, bunga, dan daun.

Melinjo dapat tumbuh secara alami di hutan tropis dan juga ditanam sebagai tanaman budidaya di kebun buah maupun di pekarangan rumah. Tanaman ini mampu tumbuh dengan baik pada lingkungan penuh penyiangan maupun di bawah naungan, sehingga dapat ditanam bersamaan dengan beberapa tanaman lainnya, seperti durian (*Durio* spp.), *Pandanus* spp, rambutan (*Nephelium lappacum*), dan *Parkia* sp. Melinjo juga memiliki kemampuan toleran terhadap kondisi kekeringan (Manner and Craig, 2006).

## 2.6 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang, tujuan, dan pustaka, maka hipotesis yang diajukan yaitu:

1. Cekaman kekeringan menggunakan PEG berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan ekspresi gen APX bibit melinjo.
2. Beda umur bibit melinjo dapat berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan ekspresi gen APX.
3. Interaksi cekaman kekeringan menggunakan PEG dan beda umur bibit melinjo dapat berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan ekspresi gen APX.

## BAB 3. METODOLOGI

### 3.1 Waktu dan Tempat

Percobaan mengenai respon pertumbuhan dan ekspresi gen ascorbate peroxidase pada melinjo (*Gnetum gnemon* L.) setelah cekaman kekeringan ini dilaksanakan pada Bulan Juli 2014 sampai dengan Februari 2015, di Agroteknopark dan *Center for Development of Advance Sciences and Technology* (CDAST), Universitas Jember.

### 3.2 Bahan dan Alat

#### 3.2.1 Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain aquadest, media tanam berupa pupuk kandang, pasir, dan tanah dengan perbandingan 1:1:1, PEG 6000, nitrogen cair, bahan isolasi RNA dalam NucleoSpin RNA Plant Kit, ascorbic acid 5 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, serta berbagai bahan pendukung lainnya.

#### 3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, polybag, timba, timbangan, mortar dan stamper, mikropipet, sentrifuge Hitachi CF15RXII, tabung reaksi, spektrofotomer Hitachi U-2900, unit PCR, serta berbagai alat pendukung lainnya.

### 3.3 Rancangan Percobaan

Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial yang terdiri atas dua faktor dengan 3 ulangan. Adapun perlakuan yang digunakan dalam percobaan ini yaitu:

Faktor I adalah perlakuan PEG, meliputi:

P0 : PEG 0%

P1 : PEG 15% (15g/100mL)

Faktor II perlakuan beda umur tanaman melinjo, meliputi:

U1: Bibit umur 1 bulan

U2: Bibit umur 2 bulan

U3: Bibit umur 3 bulan

U4: Bibit umur 4 bulan

Data hasil perlakuan dianalisis menggunakan *analysis of variant* (ANOVA) dan jika terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf 5%.

### **3.4 Pelaksanaan Percobaan**

Percobaan ini dilaksanakan secara bertahap, antara lain pembuatan media, adaptasi tanaman dan aplikasi PEG, isolasi RNA, *polymerase chain reaction* (PCR), elektroforesis DNA hasil PCR, aktivitas enzim APX, kandungan klorofil total.

#### **3.4.1 Pembuatan Media Tanam**

Media tanam yang digunakan berupa tanah, pasir, dan kompos dengan perbandingan 1:1:1. Seluruh komponen media tanam dicampur merata sesuai dengan perbandingan masing-masing kemudian dimasukkan ke dalam polybag berukuran 10 x 15 cm. Sebelum digunakan untuk penanaman, media dijenuhkan 2 hari dan diikuti dengan pengukuran kapasitas lapang media.

#### **3.4.2 Penanaman Bibit dan Aplikasi PEG**

Bibit melinjo diambil dari koleksi Laboratorium Analisis Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, kemudian ditanam ke dalam polybag yang telah berisi media. Setelah itu, bibit diadaptasikan selama 30 hari di dalam rumah kaca dan diberi perlakuan PEG 15 % selama 8 hari.

#### **3.4.3 Isolasi RNA**

Isolasi RNA menggunakan NucleoSpin RNA Plant Kit dengan sampel daun yang sebanyak 100 mg. Sampel digerus dengan penambahan nitrogen cair.

Sebanyak 350 µl buffer RA 1 dan 3,5 µl β-mercaptoethanol ditambahkan ke dalam sampel yang sudah digerus, kemudian dituang ke dalam NucleoSpin filter dan di sentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang didapat ditambahkan dengan 350 µl ethanol 10% dicampur hingga homogen. Supernatan dituangkan dalam NucleoSpin RNA Plant column dan disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 30 detik. Kemudian 350 µl *Membrane Desalting Buffer* (MDB) ditambahkan ke dalam supernatant, di sentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 1 menit. Sebanyak 95 µl rDNase ke dalam supernatant dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Supernatan dicuci 3 kali dengan penambahan 200 µl RAW2 (pencucian pertama), 600 µl RA3 (pencucian kedua), 250 µl RA3 (pencucian ketiga). Pencucian pertama dan kedua, supernatant di sentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 30 detik, sedangkan pada pencucian ketiga di sentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit. Setelah pencucian, ditambahkan 60 µl RNase-free H<sub>2</sub>O dan di sentrifus selama 1 menit pada kecepatan 11.000 rpm.

#### 3.4.4 Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Metode PCR diawali dengan tahap pembalikan RNA menjadi cDNA melalui *reverse transcription*, menggunakan sampel RNA sebanyak 650 ng disertai dengan penambahan random hexamers 2µl, dNTP mix sebanyak 4µl, 10x RT-buffer sebanyak 2 µl, RNase *inhibitor* sebanyak 1 µl, M-MLV RT sebanyak 1 µl dan *nuclease free water* hingga total volume 20µl, diinkubasi pada suhu 42°C selama 1 jam dilanjutkan dengan inkubasi dalam es selama kurang lebih 1 menit. Hasil DNA dari *reverse transcription* tersebut digunakan dalam proses PCR.

Proses PCR dilakukan dengan menggunakan total volume 50µl, yang terdiri dari 1 µl sampel DNA, 2 µl pasangan primer yang terdiri dari APX2 *forward*: CCATGGTGAAGAAGAGTTACCCGGAAGT dan APX2 *reverse*: TCTGAGATTACTCCTTGTCAGCAAACCCGA, 10x Taq-buffer sebanyak 1 µl, dNTP mix sebanyak 1 µl, e-taq sebanyak 1 µl, dan dd H<sub>2</sub>O sebanyak 38 µl. Proses PCR dilaksanakan dalam beberapa tahap, yaitu pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu

58°C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72°C, dan post-elongasi pada suhu 72°C selama 7 menit. Hasil PCR kemudian di elektroforesis dan dianalisis ketebalan pita DNA yang menunjukkan ekspresi gen APX.

#### **3.4.5 Elektroforesis DNA**

Elektroforesis DNA diawali dengan pembuatan gel agarose 1% yang dilarutkan dalam buffer TAE 1x disertai dengan penambahan ethidium bromide sebanyak 2 µl. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 volt dengan memasukkan sampel DNA hasil PCR sebanyak 4 µl.

#### **3.4.6 Analisis Aktivitas Enzim APX**

Sampel untuk analisis aktivitas enzim APX menggunakan 0.1 g daun yang diekstrak dengan menggunakan buffer ekstraksi (buffer phosphate 50mM, Tris-HCl 50mM dengan pH 7.0, dan Triton X-100 0.2%), kemudian disentrifus pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan yang didapat, diambil sebanyak 50 µl untuk pengukuran aktivitas enzim APX, dengan penambahan 2845,49 µl buffer ekstraksi, 100 µl ascorbate acid 5mM, dan 4,51 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Selanjutnya absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 290 nm (Kodkhodaie *et al.*, 2013).

#### **3.4.7 Analisis Kandungan Klorofil**

Kandungan klorofil diukur secara spektrofotometri menggunakan metode Poorter *et al.* (2011), dengan melarutkan 0.1 gram daun yang telah digerus ke dalam acetone 80%, kemudian disentrifus dengan kecepatan 4500 rpm. Supernatan yang didapat digunakan untuk pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 663 (A<sub>663</sub>), 646 (A<sub>646</sub>) dan 710 nm (A<sub>710</sub>). Kandungan klorofil total diketahui dengan menggunakan rumus:

$$\text{Klorofil total (mg/L)} = 7.18 (A_{663} - A_{710}) + 17.32 (A_{646} - A_{710})$$

### 3.5 Parameter

1. Pita DNA hasil elektroforesis
2. Aktivitas enzim APX (mmol/menit/g BB)
3. Kandungan klorofil total (mg/L)
4. Panjang akar (cm)

Panjang akar diukur mulai dari pangkal batang hingga ujung akar terpanjang pada masing-masing tanaman. Panjang akar diukur di akhir pengamatan.

5. Berat basah total (g).

Berat basah total dilakukan dengan menimbang seluruh bagian tanaman dengan menghilangkan sisa media di perakaran terlebih dahulu.

6. Rasio akar : tajuk (%)

Persentase rasio akar : tajuk diukur dengan membandingkan berat basah akar terhadap tajuk dengan rumus:

$$\text{Rasio akar : tajuk (\%)} = \text{Wa/Wt} \times 100\%$$

Keterangan:

Wa = berat basah akar (g)

Wt = berat basah tajuk (g)

7. Luas daun (cm<sup>2</sup>)

Luas daun diukur dengan metode gravimetri, dengan menggambar daun pada selembar kertas, membentuk replika daun. Replika tersebut digunting dari kertas yang berat dan luasnya sudah diketahui, sebelum ditimbang kertas dioven untuk menghomogenkan berat kertas. Luas daun kemudian ditaksir dengan perbandingan berat replika terhadap berat total kertas dengan rumus:

$$\text{Luas daun (cm}^2\text{)} = \text{Wr/Wt} \times \text{LK}$$

Keterangan:

Wr = berat kertas replika daun (g)

Wt = berat total kertas (g)

Lk = luas total kertas (cm<sup>2</sup>)

8. Tinggi tanaman (cm)

Tinggi tanaman diukur dari pangkal batang hingga titik tumbuh tanaman. Pengukuran dilakukan pada akhir pengamatan.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Nilai F-Hitung Beberapa Parameter Percobaan

Hasil anova dari beberapa parameter respon pertumbuhan dan ekspresi gen APX pada melinjo setelah cekaman kekeringan dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1.** Nilai F-Hitung beberapa parameter percobaan

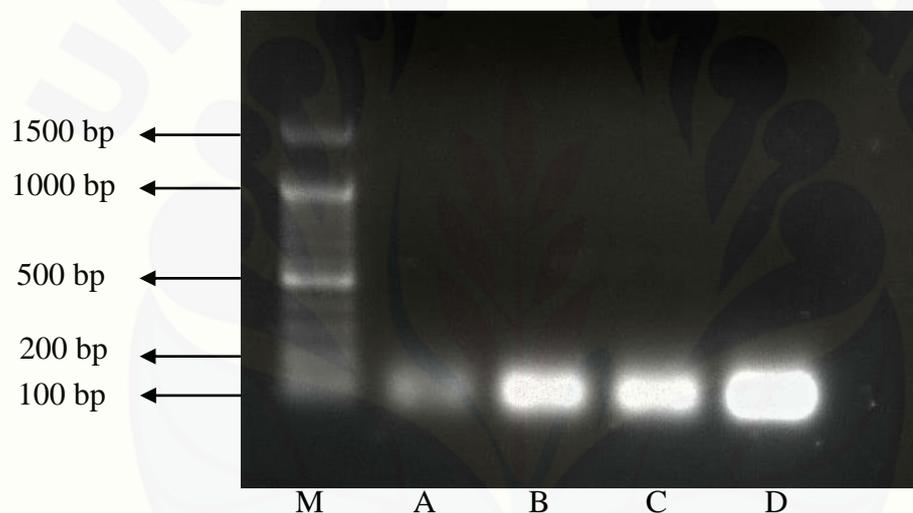
No	Parameter	Perlakuan		
		Konsentrasi PEG (P)	Beda Umur Bibit (U)	Interaksi P x U
1	Aktivitas Enzim APX	14.62**	13.11**	0.80 <sup>ns</sup>
2	Kandungan Klorofil Total	2435.12**	1135.69**	838.96**
3	Tinggi Tanaman	4.11 <sup>ns</sup>	249.40**	8.86**
4	Panjang Akar	22.92**	32.79**	1.50 <sup>ns</sup>
5	Berat Basah Total	2.35 <sup>ns</sup>	61.04**	0.66 <sup>ns</sup>
6	Rasio Akar:Tajuk	0.98 <sup>ns</sup>	10.57**	2.58 <sup>ns</sup>
7	Luas Daun	13.36**	1.40 <sup>ns</sup>	0.49 <sup>ns</sup>

Keterangan : \*\* = Berbeda sangat nyata ; ns = tidak berbeda nyata

Berdasarkan **Tabel 4.1**, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada interaksi antara PEG (0% dan 15%) dan beda umur bibit (1 bulan, 2 bulan, 3 bulan, dan 4 bulan) terhadap parameter kandungan klorofil total dan tinggi tanaman. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan umur bibit dan PEG tidak saling bebas atau saling berpengaruh terhadap tinggi tanaman maupun total klorofil. Tinggi tanaman dan kandungan klorofil total pada perlakuan beda umur bibit berbeda untuk masing-masing perlakuan PEG 0% dan PEG 15%, begitu pula sebaliknya, perlakuan PEG dapat menunjukkan pengaruh yang berbeda pada bibit umur 1 bulan, 2 bulan, 3 bulan, maupun 4 bulan. Perlakuan PEG pada parameter aktivitas enzim APX, panjang akar, dan luas daun, berbeda sangat nyata. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan PEG dapat memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas enzim APX, panjang akar dan luas daun bibit melinjo. Beda umur bibit melinjo pada parameter aktivitas enzim APX, panjang akar, berat basah total, dan rasio akar : tajuk. Hal ini menunjukkan bahwa umur bibit yang berbeda dapat mempengaruhi aktivitas enzim APX, panjang akar, berat basah total, dan rasio akar:tajuk bibit melinjo.

#### 4.2 Pengaruh Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Ekspresi Gen APX pada Bibit Melinjo

Nurhayati (2006) menyatakan bahwa perubahan ekspresi gen dapat menunjukkan berbagai respon yang terjadi selama stress dan mengontrol panjang dan pendeknya respon. Ketika tanaman mengalami cekaman kekeringan, maka akan menginduksi munculnya suatu sinyal transduksi yang kemudian menginduksi terjadinya perubahan ekspresi gen. Salah satu gen yang terinduksi dalam merespon cekaman kekeringan adalah APX. Ekspresi gen APX pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan cenderung meningkat, sebagai salah satu mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan. Peningkatan ekspresi gen APX dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



**Gambar 4.2.** Hasil elektroforesis DNA setelah PCR, M) marker DNA 1 kb, A) pita DNA bibit melinjo umur 1 bulan dengan PEG 0% (U1P0), B) pita DNA bibit melinjo umur 1 bulan dengan PEG 15% (U1P1), C) pita DNA bibit melinjo umur 4 bulan dengan PEG 0% (U4P0), dan D) pita DNA bibit melinjo umur 4 bulan dengan PEG 15% (U4P1).

Ketebalan pita DNA yang ditunjukkan pada **Gambar 4.2**, merupakan produk PCR dengan menggunakan template cDNA hasil proses *polymerase chain reaction* (PCR), template DNA yang digunakan untuk PCR didapat dari hasil *reverse transcription* (RT) *messenger* RNA (mRNA) yang diisolasi dari sampel daun bibit melinjo pada masing-masing perlakuan. Konsentrasi mRNA yang didapat dari hasil isolasi tersebut dapat dilihat pada **Tabel 4.2**. Suatu gen dapat

dikatakan berekspresi setelah melalui tahap transkripsi atau translasi, dalam hal ini template mRNA yang merupakan produk dari proses transkripsi digunakan untuk mengetahui ekspresi gen APX pada bibit melinjo.

**Tabel 4.2 Konsentrasi mRNA Hasil Isolasi dari Daun Bibit Melinjo**

Perlakuan	Konsentrasi ( $\mu\text{g/g}$ )
U1P0	50.2
U1P1	106.2
U4P0	37.4
U4P1	103.6

Keterangan : U1P0) perlakuan bibit umur 1 bulan dengan perlakuan PEG 0%, U1P1) bibit umur 1 bulan dengan perlakuan PEG 0%, U4P0) bibit umur 4 bulan dengan perlakuan PEG 0%, dan U4P1) bibit umur 4 bulan dengan perlakuan PEG 15%

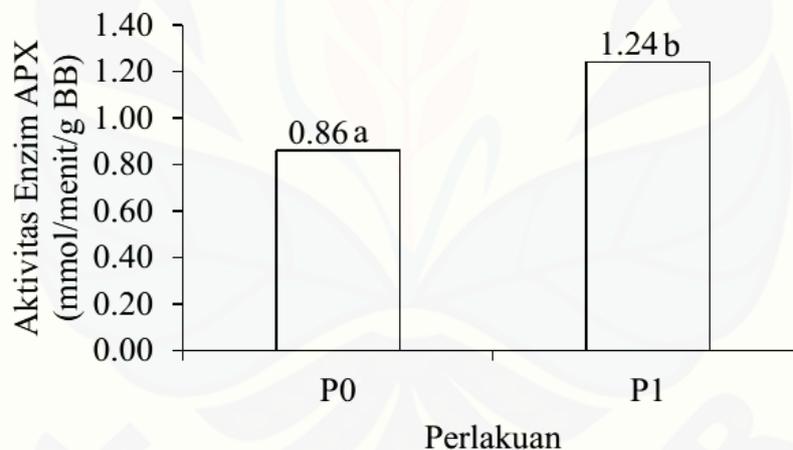
Pada **Tabel 4.2** tersebut dapat diketahui bahwa bibit dengan perlakuan PEG 15% pada umur 1 bulan maupun umur 4 bulan (U1P1 dan U4P1) konsentrasi mRNA yang didapat dari hasil isolasi, lebih besar jika dibandingkan dengan konsentrasi mRNA pada bibit dengan perlakuan PEG 0% baik pada bibit umur 1 bulan maupun 4 bulan (U1P0 dan U4P0). Semakin besar konsentrasi mRNA dapat mengindikasikan semakin besarnya ekspresi gen yang terbentuk dengan adanya cekaman kekeringan melalui induksi PEG 15%. Hal ini mengikuti pernyataan Mercuriani (2006), bahwa ekspresi suatu gen ditandai dengan terbentuknya mRNA, adanya kondisi cekaman tertentu pada tanaman akan menginduksi transkripsi mRNA dari gen-gen yang diduga berperan dalam mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman tersebut. Hal ini didukung dengan terbentuknya ekspresi gen APX yang berperan dalam membentuk mekanisme toleransi bibit melinjo terhadap cekaman kekeringan, yang ditandai dengan ketebalan pita DNA hasil elektroforesis yang ditunjukkan pada **Gambar 4.2**.

Berdasarkan **Gambar 4.2** tersebut, diketahui bahwa gen APX terekspresi pada marker DNA 1 kb, sebesar 100 bp. Hasil elektroforesis tersebut menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen APX pada bibit umur 1 bulan dan 4 bulan dengan perlakuan PEG 15% jika dibandingkan dengan perlakuan PEG 0%. Ekspresi gen APX juga terlihat meningkat pada bibit umur 4 bulan jika

dibandingkan dengan bibit umur 1 bulan, baik pada perlakuan PEG 0% maupun PEG 15%. Peningkatan ekspresi gen APX ini bisa dilihat dari ketebalan pita DNA tersebut. Semakin tebal pita DNA menunjukkan semakin banyak *copy* mRNA yang terbentuk (ekspresi gennya semakin tinggi). Pita DNA yang paling tebal adalah pada bibit umur 4 bulan dengan perlakuan PEG 15% (U4P1) dan pita DNA paling tipis terlihat pada bibit umur 1 bulan dengan perlakuan 0% PEG (U1P0). Hal ini menunjukkan adanya ekspresi gen APX terbesar pada bibit umur 4 bulan dengan perlakuan PEG 15%, hal ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen APX ketika bibit mengalami cekaman kekeringan sebagai salah satu upaya pertahanan terhadap radikal bebas akibat cekaman kekeringan. Ekspresi gen APX pada umur 1 bulan dengan perlakuan PEG 0% tidak terlalu tinggi, hal ini menunjukkan bahwa pada dasarnya pada bibit melinjo sudah terdapat gen APX namun masih belum terekspresi secara maksimal. Gen APX dapat berperan sebagai pengkode enzim antioksidan yang dapat berperan dalam mendetoksifikasi radikal bebas pada tanaman dengan menggunakan dua molekul asam askorbat sebagai donor elektron untuk mereduksi  $H_2O_2$  menjadi air yang diiringi dengan pembentukan 2 molekul monodehydroascorbate (MDHA) (Sharma *et al.*, 2012). Ekspresi gen APX ini juga berkorelasi positif dengan aktivitas enzim APX, sebagaimana Bray (1997) yang menyatakan bahwa ekspresi gen menunjukkan toleransi terhadap cekaman dan mengakumulasi produk gen tersebut sebagai suatu respon adaptasi terhadap cekaman kekeringan. Aktivitas enzim APX merupakan bentuk dari akumulasi produk gen APX, semakin tinggi aktivitas enzim APX menunjukkan semakin banyak enzim yang digunakan dalam mereduksi  $H_2O_2$  menjadi air. Pada pita DNA hasil elektroforesis menunjukkan adanya peningkatan pada masing-masing umur bibit pada setiap perlakuan, juga peningkatan yang cukup signifikan antara bibit umur 1 bulan maupun 4 bulan dengan perlakuan PEG 15% jika dibandingkan dengan perlakuan PEG 0%. Hal ini menunjukkan bahwa respon secara biokimia (melalui aktivitas enzim APX) berkorelasi positif dengan respon molekuler (ekspresi gen APX) terhadap cekaman kekeringan. Peningkatan DNA hasil elektroforis diikuti pula dengan peningkatan aktivitas enzim APX. .

### 4.3 Pengaruh Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Aktivitas Enzim APX pada Bibit Melinjo

Ascorbate peroxidase (APX) merupakan salah satu enzim yang berperan penting dalam mengeliminasi  $H_2O_2$  yang terdistribusikan pada beberapa bagian sel, seperti stroma, tilakoid, kloroplas, dan sitosol (Asada, 1992). Cekaman kekeringan pada tanaman dapat mengakibatkan peningkatan akumulasi  $H_2O_2$  yang berperan sebagai radikal bebas pada tanaman. Akumulasi  $H_2O_2$  tersebut dapat mengakibatkan toksisitas di dalam sel sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada sel, seperti kerusakan lipid, protein, dan asam nukleat. Dengan demikian, tanaman akan membentuk suatu mekanisme pertahanan di dalam sel, salah satunya adalah dengan akumulasi enzim. Berdasarkan hasil percobaan, diketahui bahwa bibit melinjo mengalami peningkatan aktivitas enzim APX pada perlakuan cekaman kekeringan menggunakan PEG 15%, dapat dilihat pada **Gambar 4.3.1**.

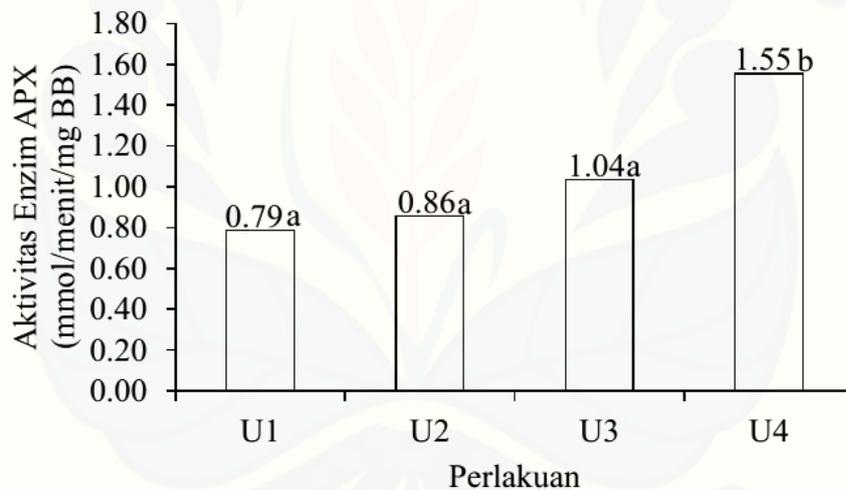


**Gambar 4.3.1.** Pengaruh PEG, PEG 0% (P0) dan PEG 15% (P1) terhadap aktivitas enzim APX. Aktivitas enzim APX ditunjukkan dalam satuan mmol/menit/ g berat basah (BB).

Berdasarkan **Gambar 4.3.1** tersebut, diketahui bahwa aktivitas enzim APX pada perlakuan P1 memiliki nilai yang lebih besar jika dibandingkan dengan perlakuan P0, 1.24 mmol/menit/g BB pada perlakuan P1 dan P0 sebesar 0.86 mmol/menit/g BB. Adanya cekaman kekeringan pada bibit melinjo dapat meningkatkan aktivitas enzim APX sebesar 44.19% jika dibandingkan dengan

bibit melinjo yang tidak mengalami cekaman kekeringan. Hal ini sesuai dengan Ahmad and Raheem (2011), bahwa aktivitas APX mengalami peningkatan pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan. Sebagaimana yang telah dijelaskan, bahwa APX merupakan salah satu enzim antioksidan. Adanya peningkatan aktivitas enzim APX tersebut merupakan salah satu mekanisme respon bibit melinjo yang mengalami cekaman kekeringan untuk membentuk suatu keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas ( $H_2O_2$ ) sebagai salah satu bentuk ketahanan terhadap cekaman kekeringan, agar tanaman mampu tetap tumbuh dan berkembang secara normal. Sebagaimana yang dinyatakan oleh Dabrowska *et al.* (2007) bahwa peran utama APX yaitu mengatur keseimbangan konsentrasi hidrogen peroksida di dalam sel.

Aktivitas enzim APX ternyata juga terpengaruhi oleh beda umur bibit melinjo, dapat dilihat pada **Gambar 4.3.2**



**Gambar 4.3.2.** Pengaruh beda umur bibit melinjo, umur 1 bulan (U1), 2 bulan (U2), umur 3 bulan (U3), dan umur 4 bulan (U4), terhadap aktivitas enzim APX.

Berdasarkan **Gambar 4.3.2**, perlakuan beda umur bibit melinjo tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata terhadap parameter aktivitas enzim APX pada perlakuan U1, U2, dan U3, namun menunjukkan perbedaan yang sangat nyata pada perlakuan U4. Aktivitas enzim APX yang terbesar adalah pada perlakuan U4 yaitu sebesar 1.55 mmol/menit/g BB atau mengalami peningkatan sebesar 96.2% jika dibandingkan dengan U1, yang memiliki aktivitas enzim APX

terendah yaitu sebesar 0.79 mmol/menit/g BB. Hal ini dapat menunjukkan kemampuan toleransi bibit melinjo pada perlakuan U4 lebih besar dibandingkan dengan perlakuan U1, U2, maupun U3. Chen *et al.* (2010) menyatakan bahwa tingginya kapasitas antioksidan dalam menangkal toksisitas yang diakibatkan oleh radikal bebas, berkaitan dengan kemampuan toleransi tanaman terhadap cekaman lingkungan. Peningkatan aktivitas enzim APX pada bibit umur 4 bulan dengan perlakuan PEG 15%, menunjukkan tingginya kemampuan toleransi bibit tersebut terhadap cekaman kekeringan yang dialami. Bray (1997) menyatakan bahwa respon tanaman terhadap cekaman kekeringan juga bergantung pada umur dan tahap pertumbuhannya.

#### 4.4 Interaksi Antara Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Kandungan Klorofil Total Bibit Melinjo

Kandungan klorofil merupakan salah satu komponen pigmen pada daun yang cukup sensitif terhadap cekaman kekeringan. Kandungan klorofil daun pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan akan cenderung lebih rendah jika dibandingkan dengan tanaman yang tumbuh di lingkungan optimal. Pengaruh interaksi perlakuan PEG dan beda umur bibit melinjo dapat dilihat pada **Tabel 4.4**.

**Tabel 4.4.** Interaksi antara perlakuan PEG dan beda umur bibit melinjo terhadap kandungan klorofil total

PEG	Umur			
	1 bulan	2 bulan	3 bulan	4 bulan
0%	14.67a	9.84a	12.10a	8.96a
	(D)	(B)	(C)	(A)
15%	8.06b	9.02b	11.35b	7.54b
	(B)	(C)	(D)	(A)

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%, Huruf kapital dalam kurung dibaca horizontal (membandingkan antar perlakuan umur). Huruf kecil tanpa kurung dibaca vertikal (membandingkan perlakuan P0 dan P1).

Interaksi antara perlakuan konsentrasi PEG dan beda umur bibit terhadap kandungan klorofil total pada perlakuan PEG dengan masing-masing umur bibit yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata, begitu pula sebaliknya, perlakuan umur yang berbeda pada masing-masing perlakuan PEG juga menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Kandungan klorofil yang terbesar terdapat pada perlakuan umur 1 bulan (U1) dengan PEG 0% (P0), berbeda nyata dengan perlakuan umur 1 bulan (U1) dengan PEG 15% (P1) maupun umur 2 bulan (U2), 3 bulan (U3), dan 4 bulan (U4) pada perlakuan P0. Sedangkan nilai kandungan klorofil terendah adalah pada perlakuan U4+P1, berbeda nyata dengan perlakuan U4+P0 maupun perlakuan U1, U2, dan U3 pada perlakuan P1. Kandungan klorofil total pada P1 cenderung lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan P0, baik pada perlakuan U1, U2, U3, maupun U4. Penurunan terbesar terdapat pada perlakuan U1+P1 terhadap U1+P0 yaitu sebesar 45.1%. Adanya penurunan kandungan klorofil tersebut menunjukkan bahwa cekaman kekeringan dapat menghambat proses sintesis klorofil, sehingga dapat menurunkan kandungan klorofil pada daun (Lisar *et al.*, 2012). Penurunan kandungan klorofil total ini dapat disebabkan oleh defisiensi air selama cekaman kekeringan yang memproduksi *reactive oxygen species* (ROS) seperti  $H_2O_2$  sehingga dapat memicu peroksidasi lipid yang juga mengakibatkan kerusakan klorofil, ditandai dengan perubahan warna hijau pada daun menjadi kekuningan (Kumar *et al.*, 2011). Penurunan kandungan klorofil terbesar ditunjukkan pada umur 1 bulan dengan perlakuan PEG 15% (U1+P1) jika dibandingkan dengan perlakuan PEG 0% pada bibit umur 1 bulan (U1+P0), hal ini menunjukkan bahwa bibit yang masih muda (berumur 1 bulan) cukup rentan mengalami kerusakan klorofil sebagai dampak terhadap cekaman kekeringan yang dialami. Kemampuan pertahanan bibit umur 1 bulan terhadap ROS tidak terlalu besar jika dibandingkan dengan umur bibit lainnya, sehingga lebih mudah mengalami kerusakan klorofil.

#### 4.5 Pengaruh Perlakuan PEG dan Beda Umur terhadap Panjang Akar Bibit Melinjo

Panjang akar merupakan salah satu indikator pertumbuhan tanaman yang mengalami cekaman kekeringan. Adanya pengaruh perlakuan PEG dan beda umur bibit melinjo terhadap panjang akar dapat dilihat pada **Tabel 4.5**

**Tabel 4.5** Pengaruh perlakuan PEG dan beda umur terhadap panjang akar bibit melinjo

Perlakuan	Panjang Akar (cm)
PEG	
0%	10.29 b
15%	6.41 a
Umur	
1 bulan	3.6 a
2 bulan	7.48 b
3 bulan	7.62 b
4 bulan	14.73 c

Keterangan: Angka pada faktor perlakuan yang sama yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%.

Berdasarkan **Tabel 4.5**, menunjukkan bahwa panjang akar pada perlakuan PEG 0% (P0) sepanjang 10.29 cm, lebih panjang dibandingkan dengan perlakuan PEG 15% (P1) yang hanya 6.41 cm. Panjang akar pada perlakuan P1 lebih pendek jika dibandingkan dengan panjang akar pada perlakuan P0. Penurunan panjang akar tersebut sebesar 37.7% jika dibandingkan dengan P0. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh cekaman kekeringan terhadap panjang akar bibit melinjo. Pada penelitian Gani *et al.* (2000) juga menunjukkan adanya penekanan panjang akar pada gandum dengan perlakuan cekaman kekeringan jika dibandingkan dengan tanaman tanpa cekaman kekeringan. Panjang akar dapat mempengaruhi besarnya serapan air dan hara yang akan ditranslokasikan ke seluruh bagian tanaman. Ketersediaan air di sekitar perakaran yang terbatas dapat menghambat perkembangan akar yang kemudian mampu mengganggu penyerapan unsur hara

oleh akar tanaman (Santosa, 1995). Terhambatnya perkembangan akar tersebut dapat menghambat pertumbuhan bibit melinjo

Panjang akar terhadap perlakuan beda umur (**Tabel 4.5**), menunjukkan bahwa nilai poanjang akar yang terbesar adalah pada perlakuan umur 4 bulan (U4) yaitu sebesar 14.73 cm yang berbeda nyata dengan perlakuan umur 1 bulan (U1), 2 bulan (U2), dan 3 bulan (U3). Panjang akar pada perlakuan U4 mengalami peningkatan sebesar 309.17% jika dibandingkan dengan perlakuan U1, 96.93% jika dibandingkan dengan U2, dan 93.31% jika dibandingkan dengan U3. Sedangkan nilai panjang akar yang terendah adapah pada perlakuan U1 yaitu sebesar 3.60 cm, berbeda nyata dengan perlakuan U2, U3, dan U4. Hal ini menunjukkan bahwa panjang akar pada bibit melinjo mengalami peningkatan seiring dengan adanya peningkatan umur bibit tersebut. Anjum *et al* (2011) menyatakan bahwa sistem perakaran berperan penting dalam menunjang pertumbuhan tanaman seiring dengan tahap pertumbuhan tanaman. Nilai panjang akar terbesar ditunjukkan pada perlakuan U4, hal ini menunjukkan bahwa meningkatnya umur bibit seiring dengan peningkatan tahap pertumbuhan tanaman, sehingga tanaman membutuhkan serapan air yang lebih besar. Hal tersebut dapat memicu terbentuknya perakaran yang lebih panjang dibandingkan dengan tanaman yang tahap pertumbuhannya lebih awal. Hal ini dapat dilihat pada perlakuan U1 yang memiliki nilai panjang akar terendah jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

#### **4.6 Pengaruh Beda Umur Bibit Melinjo terhadap Berat Basah Tanaman**

Berat basah tanaman dapat menunjukkan besarnya biomasa tanaman tersebut. Tanaman yang mengalami cekaman kekeringan akan cenderung mengalami penurunan berat basah jika dibandingkan dengan tanaman yang tidak mengalami cekaman, Zhao *et al* (2006) yang menyatakan bahwa, secara umum dampak negatif dari cekaman kekeringan yaitu penurunan produksi biomasa tanaman, baik biomasa segar maupun kering. Namun ternyata pada bibit melinjo, cekaman kekeringan menggunakan PEG 15% dengan lama perlakuan 8 hari, walaupun bibit mengalami penurunan berat basah tetapi tidak memberikan

pengaruh yang signifikan dengan adanya perlakuan PEG. Pengaruh nyata berat basah tanaman terdapat pada perlakuan beda umur bibit, dapat dilihat pada **Tabel 4.6**.

**Tabel 4.6** Pengaruh beda umur terhadap berat basah total bibit melinjo

Perlakuan Umur	Berat Basah Total (g)
1 bulan	0.79 a
2 bulan	1.27 a
3 bulan	3.46 b
4 bulan	7.83 c

Keterangan: Angka pada kolom yang sama, diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Duncan taraf 5%.

**Tabel 4.6** menunjukkan bahwa berat basah total bibit pada perlakuan umur 4 bulan (U4) memiliki nilai yang terbesar, yaitu 7.83 gram, berbeda nyata dengan umur 1 bulan (U1), 2 bulan (U2), dan 3 bulan (U3). sedangkan nilai terendah ditunjukkan pada bibit umur 1 bulan yaitu sebesar 0.79 gram, tidak berbeda nyata terhadap perlakuan U2, namun berbeda nyata terhadap perlakuan U3 dan U4. Peningkatan berat basah total pada U4 adalah sebesar 891.14% jika dibandingkan dengan perlakuan U1, 516.54% jika dibandingkan dengan U2, dan 126.3% jika dibandingkan dengan U3. Berat basah total bibit mengalami peningkatan seiring dengan adanya peningkatan umur bibit melinjo pada masing-masing perlakuan PEG (P0 dan P1). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi tingkatan umur bibit, menunjukkan semakin besar pertumbuhan yang dialaminya ditandai dengan bertambahnya akumulasi biomassa dan serapan air pada bibit tersebut. Besarnya biomassa yang diproduksi ditujukan untuk mengimbangi kebutuhan energi yang dibutuhkan bibit dalam melakukan metabolisme sehingga dapat terus tumbuh dan berkembang secara optimal. Hal ini juga ditunjukkan pada perlakuan U4 sebagai perlakuan dengan tingkatan umur yang paling tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan umur lainnya (U1, U2, dan U3), yang memiliki nilai berat basah total paling tinggi pula. Sedangkan pada perlakuan U1, sebagai perlakuan tingkatan umur yang terendah juga menunjukkan nilai berat basah

total yang terendah jika dibandingkan dengan perlakuan umur bibit lainnya (U2, U3, dan U4).

#### 4.7 Pengaruh Beda Umur terhadap Rasio Akar:Tajuk Bibit Melinjo

Rasio akar tajuk menunjukkan perbandingan antara biomass akar terhadap biomass tajuk. Tanaman yang toleran, cenderung meningkatkan produksi biomass akar dibandingkan dengan produksi biomass tajuk. Pengaruh perlakuan beda umur bibit melinjo terhadap rasio akar:tajuk dapat dilihat pada **Tabel 4.7**.

**Tabel 4.7** Pengaruh beda umur terhadap rasio akar:tajuk Bibit Melinjo

Perlakuan Umur	Rasio Akar:Tajuk (%)
1 bulan	36.51 a
2 bulan	34.41 a
3 bulan	34.30 a
4 bulan	71.71 b

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%.

Pada rasio akar : tajuk (**Tabel 4.7**), perlakuan umur 1 bulan (U1), 2 bulan (U2), 3 bulan (U3), dan 4 bulan (U4) cenderung mengalami peningkatan, namun pada perlakuan U1, U2, dan U3 tidak menunjukkan adanya beda nyata, beda nyata baru ditunjukkan pada perlakuan U4. Rasio akar:tajuk yang paling tinggi ditunjukkan pada perlakuan U4, yaitu sebesar 71.71% sedangkan yang paling rendah adalah pada perlakuan U3, yaitu sebesar 34.3% yang tidak berbeda nyata terhadap perlakuan U1 maupun U2. Secara morfologis, jumlah serabut-serabut akar pada perlakuan U4 terlihat lebih banyak jika dibandingkan dengan perlakuan U1, U2, maupun U3, ditunjukkan pada **Gambar 4.7**



**Gambar 4.7.** Morfologi akar pada masing-masing perlakuan PEG 0% (P0) dan PEG 15% (P1) dengan umur bibit melinjo yang berbeda, umur 1 bulan (U1), 2 bulan (U3), serta 4 bulan (U4).

Rasio akar : tajuk (**Tabel 4.7**) yang didukung dengan morfologi perakaran bibit melinjo (**Gambar 4.7**) tersebut, menunjukkan adanya respon pertahanan terhadap cekaman kekeringan dengan upaya pertahanan atau peningkatan biomass akar yang lebih besar dibandingkan dengan biomasa tajuk yang ditunjukkan pada besarnya rasio akar:tajuk pada perlakuan U4. Menurut Wu and Cosgrove (2000), secara umum terbatasnya ketersediaan air dapat meningkatkan rasio akar : tajuk pada tanaman karena akar memiliki sensitivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan tajuk terhadap rendahnya potensial air yang mengakibatkan penghambatan pertumbuhan tanaman. Peningkatan rasio akar : tajuk juga dapat terjadi untuk mempertahankan kemampuan penyerapan air dan menjaga tekanan osmotik di perakaran (Lisar *et al.*, 2012 ). Pada **Gambar 4.7**, nampak bahwa jumlah perakaran bibit umur 4 bulan dengan perlakuan PEG 15% (U4P1) lebih banyak dan mengindikasikan biomasa yang lebih besar dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

#### 4.8 Pengaruh Perlakuan PEG terhadap Luas Daun Bibit Melinjo

Cekaman kekeringan dengan perlakuan PEG 15% ternyata dapat berpengaruh nyata terhadap luas daun bibit melinjo pada setiap umur, umur 1 bulan (U1) dengan rata-rata jumlah daun sebanyak 2 helai, umur 2 bulan (U2) sebanyak 4 helai, umur 3 bulan (U3) sebanyak 6 helai, dan umur 4 bulan (U4) sebanyak 8 helai. Goldsworthy dan Fisher (1995) menyatakan bahwa cekaman air pada tanaman dapat mengakibatkan adanya penurunan pada pembentukan dan perluasan daun, hal ini merupakan salah satu respon komponen tanaman yang peka terhadap cekaman air. Pengaruh perlakuan PEG terhadap luas daun bibit melinjo dapat dilihat pada **Tabel 4.8**.

**Tabel 4.8** Pengaruh perlakuan PEG terhadap luas daun bibit melinjo

Perlakuan PEG	Luas Daun (cm <sup>2</sup> )
0%	19.74 a
15%	16.61 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%.

Luas daun rata-rata pada perlakuan PEG 0% (P0) adalah sebesar 19.74 cm<sup>2</sup> dan perlakuan P1 sebesar 16.61 cm. Rata-rata luas daun pada perlakuan P1 lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan P0, hal ini menunjukkan adanya penurunan sebesar 15.9% pada perlakuan P1 jika dibandingkan dengan P0. Penurunan luas daun merupakan salah satu respon morfologis pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan, sebagai upaya menekan laju transpirasi tanaman guna efisiensi penggunaan air pada tanaman terkait dengan sangat terbatasnya suplai air. Penyempitan daun yang ditandai dengan menurunnya luas daun ini juga dapat mempengaruhi efektifitas fotosintesis pada daun. Semakin kecil luas permukaan daun bisa jadi dapat mengakibatkan semakin sedikitnya cahaya matahari yang terserap sebagai energi utama proses fotosintesis. Hal ini dapat mengakibatkan rendahnya fotosintat yang dihasilkan sehingga mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Fahn (1992) menyatakan bahwa kemampuan daun untuk menghasilkan produk fotosintat ditentukan oleh

produktifitas per satuan luas daun dan total luas daun. Dengan demikian, ada kecenderungan bahwa bibit umur 4 bulan yang memiliki jumlah daun terbanyak, mampu menghasilkan fotosintat yang lebih besar dibandingkan dengan bibit umur 1 bulan, 2 bulan, dan 3 bulan. Hal ini menunjukkan bahwa bibit umur 4 bulan yang mengalami cekaman kekeringan memiliki energi yang lebih besar untuk tetap tumbuh dan berkembang dibandingkan dengan bibit dengan umur 1 bulan, 2 bulan, dan 3 bulan, sehingga dapat mengindikasikan bibit umur 4 bulan lebih memiliki kemampuan untuk tetap tumbuh dan berkembang dalam kondisi tercekam.

#### 4.9 Interaksi Antara Perlakuan PEG dan Beda Umur Bibit Melinjo terhadap Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman merupakan salah satu parameter pertumbuhan tanaman yang cukup mudah diamati. Berdasarkan nilai F-hitung (**Tabel 4.1**), pada parameter tinggi tanaman menunjukkan hasil yang signifikan baik pada perlakuan PEG, beda umur bibit, maupun interaksi antara perlakuan PEG dan umur bibit. Adapun pengaruh interaksi perlakuan PEG dan beda umur bibit melinjo terhadap tinggi tanaman ini dapat dilihat pada **Tabel 4.9**.

**Tabel 4.9.** Interaksi perlakuan PEG dan beda umur bibit melinjo terhadap tinggi tanaman

Konsentrasi PEG	Umur			
	1 bulan	2 bulan	3 bulan	4 bulan
0 %	16.70a (B)	13.83a (A)	24.53a (C)	34.05a (D)
15 %	13.09a (A)	15.95a (B)	20.23a (C)	32.75a (D)

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Duncan 5%. Huruf kapital dalam kurung dibaca horizontal (membandingkan antar perlakuan umur). Huruf kecil tanpa kurung dibaca vertikal (membandingkan perlakuan P0 dan P1).

Interaksi antara perlakuan umur (1 bulan, 2 bulan, 3 bulan, dan 4 bulan) dan PEG (0% dan 15%) terhadap tinggi tanaman menunjukkan bahwa nilai terbesar terdapat pada perlakuan umur 4 bulan (U4) dengan PEG 0% (P0) yaitu sebesar 34.05 cm, tidak berbeda nyata terhadap perlakuan U4 dengan PEG 15% (P1) (secara vertikal), namun terdapat beda nyata jika dibandingkan dengan umur 1 bulan (U1), 2 bulan (U2), dan 3 bulan (U3) pada P0 (secara horizontal, dibandingkan dengan U1, U2, dan U3 pada P0). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan PEG pada umur yang berbeda dapat memberikan pengaruh yang nyata terhadap tinggi tanaman. Nilai tinggi tanaman terendah ditunjukkan pada perlakuan U1 dengan P1 yaitu sebesar 13.09 cm, tidak berbeda nyata terhadap perlakuan U1 dengan P0, namun berbeda nyata dengan perlakuan umur U2, U3, serta U4 pada perlakuan P1. Peningkatan tinggi tanaman pada bibit umur 1 bulan (U1) hingga bibit umur 4 bulan (U4) menunjukkan adanya pertumbuhan seiring bertambahnya umur bibit melinjo. Pertumbuhan tanaman diikuti dengan pemanjangan, pembelahan, dan pembesaran sel (Mangel and Kirkby, 1987). Semakin tinggi tingkat umur bibit melinjo bisa jadi menunjukkan adanya pemanjangan, pembelahan, dan pembesaran sel yang lebih besar dibandingkan dengan tingkat umur bibit yang lebih kecil.

#### **4.10 Pembahasan Umum**

Penggunaan senyawa PEG 15% dapat mengikat air yang ada di media tanam sehingga air tidak tersedia bagi tanaman, sehingga tanaman dapat mengalami kekeringan. Rahayu *et al.* (2005), menyatakan bahwa PEG merupakan senyawa yang dapat menurunkan potensial osmotik dengan matriks etilena oksida yang mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen, sehingga diharapkan mampu menciptakan kondisi cekaman karena kurangnya ketersediaan air bagi tanaman. Cekaman kekeringan yang terjadi dapat mempengaruhi ekspresi gen dan pertumbuhan tanaman. Ekspresi gen APX pada bibit melinjo mengalami peningkatan seiring dengan adanya cekaman kekeringan (perlakuan PEG 15%), baik pada level transkripsi maupun translasi. Ekspresi gen APX ini dapat berperan dalam sistem pertahanan terhadap ROS yang meningkat dengan adanya cekaman,

sebagai antioksidan. Pada level transkripsi dapat diketahui berdasarkan pita DNA hasil elektroforesis dengan menggunakan *template* cDNA yang didapat dari hasil *reverse transcription* mRNA, sebagai produk dari level transkripsi. Konsentrasi mRNA dapat menunjukkan indikasi awal adanya peningkatan ekspresi gen. Bibit melinjo dengan perlakuan PEG 15% memiliki konsentrasi mRNA yang lebih besar dibandingkan dengan perlakuan PEG 0%, hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi gen pada bibit yang mengalami cekaman kekeringan (bibit dengan perlakuan PEG 15%) dibandingkan dengan bibit yang tidak mengalami kekeringan. Peningkatan konsentrasi mRNA tersebut juga diikuti dengan semakin tebalnya pita DNA hasil elektroforesis. Semakin tebal pita DNA menunjukkan semakin banyak *copy* mRNA yang terbentuk, mengindikasikan ekspresi gennya semakin tinggi. Hasil elektroforesis DNA juga menunjukkan adanya peningkatan ekspresi pada bibit umur 4 bulan dibandingkan dengan bibit umur 1 bulan. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi gen APX seiring dengan bertambahnya umur bibit melinjo. Peningkatan ekspresi gen APX pada level transkripsi dapat memicu terjadinya peningkatan enzim APX pula, sebagai produk pada level translasi. Dalam penelitian ini, peningkatan enzim APX dilihat berdasarkan aktivitas enzim, bibit melinjo dengan perlakuan PEG 15% menunjukkan aktivitas yang lebih besar dibandingkan dengan bibit melinjo, begitu pula bertambahnya umur bibit melinjo juga menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim APX, terutama pada bibit umur 4 bulan dibandingkan dengan bibit umur 1 bulan, 2 bulan, maupun 3 bulan. Berdasarkan konsentrasi mRNA, ketebalan pita DNA hasil elektroforesis, dan aktivitas enzim APX, menunjukkan adanya korelasi positif bahwa tingginya konsentrasi mRNA menunjukkan besarnya *copy* mRNA yang terbentuk disertai dengan semakin tebalnya pita DNA hasil elektroforesis, yang kemudian diikuti semakin besarnya aktivitas enzim APX yang terbentuk. Yoshimura *et al.* (2000), menyatakan bahwa untuk mengetahui respon awal enzim APX terhadap cekaman dapat dilakukan dengan menganalisis perubahan pada transkripsi dan level protein serta aktivitas enzimnya selama terjadi cekaman. Mittler and Zilinskans (1994) juga menyatakan bahwa ekspresi cytosolic APX pada daun tanaman kacang hijau,

dipengaruhi pada level post transkripsi yang turut berperan dalam sintesis protein dan atau aktivasi enzim. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa besarnya aktivitas enzim APX bergantung pada besarnya cDNA yang terbentuk dari besarnya *copy* mRNA dan disertai dengan substrat yang tersedia pada tanaman.

Sedangkan pada pertumbuhan tanaman, cekaman kekeringan dapat menurunkan luas daun, tinggi tanaman, dan panjang akar. Selama pertumbuhan vegetative, kekeringan dapat menurunkan tinggi tanaman, diameter batang, dan luas daun (Agele, 2003), serta dapat menekan pemanjangan akar (Gani, 2000). Semakin sempitnya luas daun dapat menurunkan kemampuan fotosintesis yang nantinya dapat menurunkan fotosintat yang dihasilkan. Zlatev and Fernando (2012), menyatakan bahwa Kekeringan merupakan salah satu faktor utama yang dapat menghambat fotosintesis dan mengakibatkan penurunan pertumbuhan dan produktivitas tanaman. Fotosintat digunakan tanaman sebagai energi dalam melakukan berbagai metabolisme, termasuk berkaitan dengan kemampuan tumbuh yang berkaitan dengan penambahan tinggi tanaman dan panjang akar. Hal ini menunjukkan adanya korelasi antara luas daun terhadap kemampuan fotosintesis yang nantinya dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Menurunnya kemampuan fotosintesis tersebut juga dipengaruhi oleh rendahnya kandungan klorofil total pada tanaman yang tercekam kekeringan. Cekaman kekeringan dapat menghambat sintesis klorofil, sehingga kandungan klorofil yang ada di daun lebih rendah dibandingkan dengan tanaman yang tidak mengalami cekaman kekeringan. Klorofil merupakan zat hijau di dalam sel tanaman yang berperan penting dalam proses fotosintesis, dengan mengabsorpsi cahaya matahari yang akan digunakan sebagai energi dalam sintesis karbohidrat dari karbondioksida dan air (Khalegi *et al.*, 2012). Sehingga sedikitnya kandungan klorofil pada daun juga berpengaruh pada penurunan kemampuan fotosintesis yang pada akhirnya diikuti dengan rendahnya fotosintat yang dapat mengakibatkan pertumbuhan tanaman, dalam hal ini dapat dilihat pada panjang akar dan tinggi tanaman yang lebih rendah pada bibit melinjo dengan perlakuan cekaman kekeringan (PEG 15%) dibandingkan dengan bibit melinjo yang tidak mengalami cekaman kekeringan (PEG 0%), pada semua umur bibit.

Tingginya ekspresi gen APX pada bibit melinjo pada umur 4 bulan, dibandingkan dengan bibit umur 1 bulan, 2 bulan, maupun 3 bulan, berkecenderungan memiliki kemampuan adaptasi yang lebih besar terhadap cekaman kekeringan (PEG 15%). Hal ini diikuti pula secara morfologis dengan adanya peningkatan rasio akar : tajuk pada bibit umur 4 bulan dengan perlakuan PEG 15% dibandingkan dengan bibit umur 1 bulan, 2 bulan, dan 3 bulan, baik pada perlakuan PEG 15% maupun PEG 0%. Tingginya rasio akar:tajuk menunjukkan adanya peningkatan biomasa akar yang lebih besar dibandingkan dibandingkan tajuk. Akar merupakan bagian utama yang berperan dalam penyerapan air, sehingga distribusi biomasa lebih cenderung terjadi pada akar agar akar mampu tumbuh dan bekerja optimal dalam proses penyerapan air dan mineral agar tanaman dapat tetap tumbuh dan berkembang. Bibit melinjo umur 4 bulan dengan perlakuan PEG 15% masih menunjukkan adanya pertumbuhan setelah mengalami cekaman kekeringan dibandingkan bibit umur 1 bulan, 2 bulan, dan 3 bulan, dengan adanya sistem pertahanan terhadap cekaman kekeringan, seperti terjadinya peningkatan ekspresi gen APX yang dapat mendetoksifikasi ROS diikuti dengan produksi biomasa akar dan luas daun yang lebih besar pada bibit umur 4 bulan dibandingkan dengan bibit umur 1 bulan, 2 bulan, dan 3 bulan.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil percobaan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Cekaman kekeringan dengan menggunakan PEG 15 % dapat mempengaruhi pertumbuhan bibit melinjo terutama pada penghambatan panjang akar sebesar 37.7% dan luas daun dengan penurunan sebesar 16.9%, namun dapat meningkatkan ekspresi gen dan aktivitas enzim APX sebesar 44.19% jika dibandingkan dengan perlakuan PEG 0%.
2. Umur bibit melinjo yang berbeda dapat mempengaruhi pertumbuhan dan ekspresi gen serta aktivitas enzim APX. Semakin tinggi tingkat umur bibit, semakin tinggi nilai aktivitas enzim APX, panjang akar, berat basah total, dan rasio akar : tajuk.
3. Interaksi umur bibit yang berbeda dengan perlakuan cekaman kekeringan menggunakan PEG 15% dapat berpengaruh terhadap kandungan klorofil total dan tinggi tanaman.

### 5.2 Saran

Penelitian yang akan dilakukan selanjutnya, diharapkan dapat melakukan beberapa hal, antara lain:

1. Melakukan deteksi ekspresi gen APX lebih lanjut pada level translasi, dengan menggunakan analisis *western blot*.
2. Menggunakan bibit dengan fase pertumbuhan yang berbeda sehingga dapat lebih mengetahui respon tanaman pada cekaman kekeringan.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Agele, S.O. 2003. Sunflower Response to Weather Variations in Rainy Dry, Cropping Seasons in Tropical Rainforest Zone. *International Journal of Biotronics*, 32: 17-33
- Ahmad, S.T and Raheem, H. 2011. Study of Silicon Effects on Antioxidant Enzyme Activities and Osmotic Adjustment of Wheat Under Drought Stress. *Genet. Plant Breed*, 47(1): 17-27
- Ahmadizadeh, M. 2013. Physiological and Agro-Morphological Response to Drought Stress. *Scientific Research*, 13(8): 998:1009
- Ai, N.S. 2011. Biomassa dan Kandungan Klorofil Total Daun Jahe (*Zingiber officinale* L.) yang Mengalami Cekaman Kekeringan. *Ilmiah Sains*, 11(1): 1-5
- Alberts, B., Alexander, J., Julian, L., Martin, R., Keith, R., and Peter, W. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc. New York.
- Anjum, S.A., Xie, X., and Wang, L. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Agr. Res.* 6: 2026-2032
- Asada, K., 1992. Ascorbate Peroxidase - Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants. *Physiol. Plant.*, 85: 235–241
- Asada, K. 1999. The Water-water Cycle in Chloroplast Scavenging of Active Oxygen and Dissipation of Excess Photons. *Plant Physiol. Plan Mol. Biol.*, 50:601-639
- Astuti, A.F. 2008. Ekspresi Gen Responsif Terhadap Reactive Oxygen Species pada *Hevea brasiliensis* Akibat Pelukaan dan Etilena Eksogen. *Skripsi*. FMIPA Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Ausubel, M., Roger, B., Robert, E.K., David, D.M., Seidmen, J.G., John, A.S., and Kevin, S. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons. New York.
- Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen). 2010. Menguji Ekspresi Gen Menggunakan Real-Time PCR. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 32(6): 13-14.
- Bhargava, S and Kshitija, S. 2013. Drought Stress Adaptation: Metabolic Adjustment and Regulation of Gene Expression. *Plant Breeding*, 132: 21-32

- Bibi, A., Sadaqat, H.A., Tahir, M.H.N., and Akram, H.M. 2012. Screening of Sorghum (*Sorghum bicolor* Var Moench) for Drought Tolerance at Seedling Stage in Polyethylene Glycol. *Animal and Plant Science*, 22(3): 671-678
- Bray. 1993. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol*, 103: 1035-1040
- Bray, E.A. 1997. Plant Responses to Water Deficit. *Trends Plant Science*, 2: 48-54
- Camillo, L.R., Ciro, R.F., Paulo, S.M., Ronan, X.C., Karina, P.C., and Fabienne, M. 2013. Tc-cAPX, a Cytosolic Ascorbate Peroxidase of *Theobroma cacao* L. Engaged in the Interaction with *Monilophthora perniciosa*, the Causing Agent of Witches Broom Disease. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 254-265
- Caverzan, A., Gisele, P., Silvia, B.R., Carolina, W.R., Fernanda, L., and Marcia, M.P. 2012. Plant Response to Stresses: Role of Ascorbate Peroxidase in The Antioxidant Protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4):1-10
- Chen, Q., Zhang, M., and Shen, S. 2010. Effect of Salt on Malondialdehyde and Antioxidant Enzymes in Seedling Roots of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(2): 273-278
- Dabrowska, G., Alexandra, K., Anna, G., Magdalena, S.H., and Edyta, S. 2007. Characteristics of The Plant Ascorbate Peroxidase Family. *Acta Biologica Cracovinensia series Botanica*, 49 (1): 7-17
- Dodd and Donovan. 1999. Water Potential and Ionic on Germination and Seedling Growth of Two Cold Desert Shrubs. *Botany*, 86: 1146-1163
- Dorak, M.T. 2006. *Real-Time PCR*. Taylor and Francis Group. France
- Efendi, R., Suwardi, dan Musdalifaf, I. 2010. Metode dan Penentuan Karakter Seleksi Genotipe Jagung terhadap Cekaman Kekeringan pada Fase Awal Vegetatif. *Prosiding Pekan Serealia Nasional*, 230-240
- Fahn, A. 1992. *Anatomi Tumbuhan*. PT. Gramedia. Jakarta
- Frederick, L., Crane, D., James, M., and Hans, E.L. 2000. *Oxidation at the Plasma Membrane Relation to Growth and Transport, Volume 2*. CRC Press, Inc. Florida
- Gaman, M. 1992. *Ilmu Pangan, Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi, dan Mikrobiologi Edisi II*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta

- Gani, J.A., 2000. *Kedelai Varietas Unggul*. Lembar informasi pertanian (LIPTAN), Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian, Mataram
- Goldsworthy, P.R. dan N.M.Fisher. 1995. *Fisiologi Tanaman Budidaya Tropik. Diterjemahkan oleh Tohari*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Halliwell, B. 2006. Reactive Species and Antioxidants, Redox Biology is Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol*, 141:312-322.
- Halliwell, B. 1974. Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidases: Solutions to the Problems of Solving of Living with Oxygen. *New Phytol*, 73: 1075-1086
- Hartati, N.S., Wahyuni., Siti, K., Nurhamidar, R., dan Enny, S. 2013. *Analisis Ekspresi Gen Aquaporin dan Induksi Embriogenesis Ubi Kayu untuk Peningkatan Toleransi Kekeringan Ubi Kayu Produksi Tinggi Melalui Pendekatan Molekuler*. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Jakarta
- Jiang, Y., Erie, W., Shuwei, L., Xiaoqing, Y., and Na, L. 2010. Antioxidative Response and Candidate Gene Expression in Prairie Junegrass Under Drought Stress. *American Society for Horticultural Science*, 135(4): 303-309
- Khalegi, E., Arzani, K., Moallemi, N., and Barzegar, M. 2012. Evaluation of Chlorophyll Content and Chlorophyll Fluorescence Parameters and Relationships between Chlorophyll a, b, and Chlorophyll Content Index under Water Stress in *Olea europaea* cv. Dezful. *World Academy of Science Engineering and Technology*, 6(8): 2106-2111
- Kodkhodaie, A., Jamshid, R., and Morteza, Z. 2013. Peroxidase, Ascorbate Peroxidase, and Catalase Activities in Drought Sensitive, Intermediate, and Resistance Sesame (*Sesamum indicum* L.) Genotypes. *Agronomy and Plant Production*, 4(11): 3012-3021
- Kumar, R.R., Krishna, K., and Naik, G.R. 2011. Effect of Polyethylene Glycol Induced Water Stress on Physiological and Biochemical Response in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.Millsp.). *Plant Research in Science and Technology*, 3(1): 148-152
- Lisar, S.Y.S., Mosharraf, M.H., and Ismail, M.M.R. 2012. *Water Stress in Plants: Causes, Effects, and Responses*. <http://www.intechopen.com/books/water-stress/water-stress-in-plants-causes-effects-and-responses>. Diakses pada tanggal 01 April 2015

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaire, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S., and Darnell, J. 2004. *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman. New York
- Makkar, H.P.S., Dawra, R.K., and Singh, B. 1988. Determination of Both Tannin and Protein in a Tannin-Protein Complex. *Agric. Food Chem*, 36: 523-525.
- Manner, H.I and Craig, R.E. 2006. *Gnetum gnemon* L. (gnetum). *Species Profile for Pacific Island Agroforestry*, 1(1): 1-8
- Mengel, K. and Kirkby, E.A. 1987. *Principles of Plant Nutrition*, 4<sup>th</sup> Edition. International Potash Institute, IPI. Switzerland
- Mercuriani, I.S. 2006. *Isolasi Gen-gen pada Tanaman yang Ekspresinya Diinduksi oleh Cekaman Lingkungan*. Seminar Nasional MIPA. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta
- Michel and Kaufman. 1973. The Osmotic Potential of Polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol*, 57:914-916
- Mittler, R and Zilinskins, B.A. 1994. Regulations of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase and Other Antioxidant Enzymes During the Progression of Drought Stress and Following Recovery from Drought. *Plan. J.*, 5: 397-405
- Nakano, Y and Asada, K. 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22: 867-880
- Nonami, H. 1998. Plant Water Relations and Control of Cell Elongation at lower Water Potentials. *Plant Res.*, 111: 373-382
- Nurhayati. 2006. Ekspresi Gen Selama Defisit Air. *Penelitian Bidang Ilmu Pertanian*, 4(1): 18-23
- Poorter, H., Yvone, D.J.V.B., and PrometheusWiki contributors. 2011. *Chlorophyll Extraction and Determination*. PrometheusWiki. [www.publish.csiro.au/prometheuswiki/tiki-pagehistory.php?page=chlorophyll extraction and determination&preview=11](http://www.publish.csiro.au/prometheuswiki/tiki-pagehistory.php?page=chlorophyll%20extraction%20and%20determination&preview=11)>. Diakses pada tanggal 03 Februari 2015
- Purnomosidhi, P., Suparman., James, M.R., dan Mulawarman. 2002. *Perbanyakan dan Budidaya Tanaman Buah-Buahan*. International Centre for Research in Agroforestry (ICRAF) dan Winrock International. Bogor
- Racchi, M.L. 2013. Antioxidant Defense in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* Spp. *Antioxidants*, 2(4): 340-369

- Rahayu, E.S., Edi, G., Satriya, I., dan Sudarsono. 2005. Polietilena Glikol (PEG) dalam Media *In Vitro* Menyebabkan Kondisi Cekaman yang Menghambat Tunas Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.). *Berk. Penel. Hayati*, 11: 39-48
- Santosa, B. 1995. *Pengaruh Kandungan Air Tanah dan Pemupukan terhadap Penyerapan Nitrogen Tanaman Tebu Lahan Kering Varietas F-154*. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang
- Sharma, P., Ambuj, B.J., Rama, S.D., and Mohammad, P. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants Under Stressful Conditions. *Botany*, 10: 1-26
- Shikanai, T., Tor, T., Haruko, Y., Satoshi, S., Ken-Ichi, T., Akiho, Y., and Shigeru, S. 1998. Inhibition of Ascorbate Peroxidase Under Oxidative Stress in Tobacco Having Bacterial Catalase in Chloroplast. *Febs Letters*, 428: 47-51
- Siswoyo, T.A dan Bambang, S. 2012. *Produksi Pengembangan Protein Antihipertensi Generasi Baru dari Gnetum gnemon L. Protein Sebagai Bahan Nutraceutical Komersial*. Prosiding InSINas 2012
- Siswoyo, T.A., Eka, M., and Keizo, H. 2011. Isolation and Characteristic of Antioxidant Protein Fraction from Melinjo (*Gnetum gnemon* ) Seed. *Agriculture and Food Chem.* 59:18-56
- Sunanta, H. 1991. *Budidaya Melinjo dan Usaha Produksi Emping*. Kanisius. Yogyakarta
- Sutjahjo, S.H., Abdul, K., dan Ika, M. 2007. Efektivitas Polietilena Glikol Sebagai Bahan Penyeleksi Kalus Nilam yang Diradiasi Sinar Gamma untuk Toleransi Terhadap Cekaman Kekeringan. *Ilmu-ilmu Pertanian*, 9 (1): 48-49
- Tarantino, D., Vannini, C., Bracele, M., Campa, M., Soave, C., and Murgia, I. 2005. Antisense reduction of Thylakoid Ascorbate Peroxidase in *Arabidopsis* Enhances Paraquat Induced Photooxidative Stress and Nitric Oxide Induced Cell Death. *Planta*, 221: 757-765
- Wintermans and De Mots. 1965. Spectrophotometric Characteristics of Chlorophylls a and b and Their Pheophytins in Ethanol. *Biochim Biophys. Acta.* 109: 448-453
- Wu, Y. and Cosgrove, D.J. 2000. Adaptation of Roots to Low Water Potentials by Changes in Cell Wall Extensibility and Cell Wall Proteins. *Exp. Bot.*, 51:1543-1553

- Yoshimura, K., Yukinori, Y., Takahiro, I., and Shigeru, S. 2000. Expression of Spinach Ascorbate Peroxidase Isoenzymes in Response to Oxidative Stresses. *Plant Physiology*, 123: 223-233
- Zhao, T.J., Sun, S., Liu, Y., Liu, J.M., Liu, Q., Yan, Y.B., and Zhou, H.M. 2006. Regulating the Drought-Responsive Element (DRE) Mediated Signalling Pathway by Synergic Functions of Trans-active and Trans-inactive DRE Binding Factors in *Brassica napus*. *Biol. Chem.*, 281: 10752-10759
- Zlatev, Z and Fernando, C.L. 2012. An Overview on Drought Induced Changes in Plant Growth, Water Relations and Photosynthesis. *Emir. J. Food Agric.*, 24(1): 57-72
- Zou, H., Guangyuan, M., Ran, W., Yawei, Z., Yilkun, C., and Le, J. 2012. Biochemical Properties of Oxidases of Yali Pear. *African Journal of Biotechnology*, 11(53): 11610-11619

**LAMPIRAN**

**Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian**



Populasi Bibit Melinjo



Pengamatan Tinggi Tanaman



Ekstraksi Sampel



Pengukuran Absorbansi Enzim APX

Lampiran 2. Analisis Aktivitas Enzim APX

Perla- kuan	Nilai Absorbansi pada menit ke-						$\Delta$ absorban			$\epsilon$ mM- 1cm- 1	x(mmol/menit)			mmol/menit/g BB			Rata- rata
	0			2			1	2	3		1	2	3	1	2	3	
	1	2	3	1	2	3											
U1P0	0.519	0.484	0.479	0.513	0.475	0.473	0.005	0.006	0.007	2.8	0.054	0.064	0.075	3.33	26.667	0.067	10.022
U2P0	0.339	0.235	0.333	0.333	0.228	0.322	0.006	0.009	0.006	2.8	0.064	0.096	0.064	7.358	31.111	0.093	12.854
U3P0	0.388	0.4795	0.321	0.373	0.4665	0.314	0.006	0.007	0.011	2.8	0.064	0.075	0.118	2.732	16.970	0.051	6.584
U4P0	0.961	1.052	1.252	0.95	1.045	1.244	0.015	0.013	0.007	2.8	0.161	0.139	0.075	4.187	26.667	0.200	10.351
U1P1	0.678	0.794	0.714	0.669	0.786	0.704	0.011	0.007	0.008	2.8	0.118	0.075	0.086	14.513	23.333	0.128	12.658
U2P1	0.468	0.637	0.413	0.457	0.626	0.401	0.009	0.008	0.01	2.8	0.096	0.086	0.107	6.571	18.667	0.084	8.440
U3P1	0.531	0.425	0.535	0.512	0.41	0.517	0.011	0.011	0.012	2.8	0.118	0.118	0.129	3.119	15.556	0.086	6.253
U4P1	0.519	0.484	0.479	0.513	0.475	0.473	0.019	0.015	0.018	2.8	0.204	0.161	0.193	2.681	10.370	0.099	4.383

Tabel Anova

<b>Keragaman</b>	<b>db</b>	<b>JK</b>	<b>KT</b>	<b>F hitung</b>	<b>F tabel 5%</b>	<b>F tabel 1%</b>	
Baris (PEG)	1	0.804	0.804	14.617	4.49	8.531	**
Kolom (Umur)	3	2.163	0.721	13.110	3.24	5.292	**
Interaksi	3	0.132	0.0438	0.797	3.24	5.292	ns
Galat	16	0.880	0.055				
Total	23	154.041					

Uji Lanjut menggunakan Duncan 5 %

1. Uji lanjut pada perlakuan PEG

	<b>Rata-rata</b>	<b>P0</b>	<b>P1</b>	<b>Notasi</b>
		<b>0.86</b>	<b>1.24</b>	
P0	0.86	0		a
P1	1.24	0.38	0	b

2. Uji lanjut pada perlakuan umur

	<b>Rata-rata</b>	<b>U1</b>	<b>U2</b>	<b>U3</b>	<b>U4</b>	<b>Notasi</b>
		<b>0.79</b>	<b>0.86</b>	<b>1.04</b>	<b>1.55</b>	
U1	0.79	0				a
U2	0.86	0.071	0			a
U3	1.04	0.25	0.18	0		a
U4	1.55	0.77	0.70	0.52	0	b

**Lampiran 3. Analisis Kandungan Klorofil Total**

Perlakuan	Absorbansi pada panjang gelombang									Klorofil total (mg/L)			Rata-rata
	646 nm			663 nm			710 nm			1	2	3	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
U1P0	0.557	0.742	0.671	1.067	1.250	1.194	0.115	0.282	0.228	14.49	14.92	14.61	14.67
U2P0	0.386	0.394	0.391	0.768	0.776	0.776	0.094	0.107	0.102	9.90	9.77	9.84	9.84
U3P0	0.700	1.015	0.864	1.114	1.426	1.267	0.332	0.636	0.489	11.99	12.24	12.08	12.1
U4P0	0.544	0.568	0.652	0.883	0.904	0.979	0.274	0.302	0.384	9.05	8.93	8.91	8.96
U1P1	0.295	0.311	0.306	0.583	0.597	0.592	0.047	0.068	0.062	8.14	8.01	8.03	8.06
U2P1	0.374	0.365	0.415	0.719	0.709	0.762	0.102	0.092	0.138	9.02	9.05	8.98	9.02
U3P1	0.372	0.371	0.412	0.775	0.772	0.813	0.029	0.024	0.066	11.3	11.38	11.36	11.35
U4P1	0.321	0.308	0.314	0.566	0.546	0.547	0.086	0.077	0.067	7.52	7.37	7.72	7.54

Tabel Anova

<b>Keragaman</b>	<b>db</b>	<b>JK</b>	<b>KT</b>	<b>F hitung</b>	<b>F tabel 5%</b>	<b>F tabel 1%</b>	
Baris (PEG)	1	34.680	34.680	2435.116	4.49	8.531	**
Kolom							
(Umur)	3	48.522	16.174	1135.686	3.24	5.292	**
Interaksi	3	35.845	11.948	838.962	3.24	5.292	**
Galat	16	0.228	0.0142				
Total	23	206.274					

## Hasil Uji Lanjut

## 1. Perlakuan umur terhadap P0

	<b>Rata-rata</b>	<b>U4</b>	<b>U2</b>	<b>U3</b>	<b>U1</b>	<b>Notasi</b>
		<b>8.96</b>	<b>9.84</b>	<b>12.10</b>	<b>14.67</b>	
U4	8.96	0				a
U2	9.84	0.87	0			b
U3	12.10	3.14	2.27	0		c
U1	14.67	5.71	4.84	2.57	0	d

## 2. Perlakuan umur terhadap P1

	<b>Rata-rata</b>	<b>U4</b>	<b>U1</b>	<b>U2</b>	<b>U3</b>	<b>Notasi</b>
		<b>7.54</b>	<b>8.06</b>	<b>9.02</b>	<b>11.35</b>	
U4	7.54	0				a
U1	8.06	0.52	0			b
U2	9.02	1.48	0.96	0		c
U3	11.35	3.81	3.29	2.33	0	d

## 3. Perlakuan P0 dan P1

	<b>Rata-rata</b>	<b>P1</b>	<b>P0</b>	<b>Notasi</b>
		<b>8.99</b>	<b>11.39</b>	
P1	8.99	0		a
P0	11.39	2.4	0	b

## Lampiran 4. Tinggi Tanaman Setelah Perlakuan

Perlakuan	Ulangan	U1	U2	U3	U4	Rata-rata
P0	1	16.7	16	27.1	35.5	22.27
	2	16.5	11.7	22	32.6	
	3	16.9	13.8	24.49	34.05	
	Rata-rata	16.7	13.83	24.53	34.05	
P1	1	13.9	15.7	21	32.7	20.5
	2	12.1	16.2	19.5	32.8	
	3	13.27	15.95	20.2	32.75	
	Rata-rata	13.09	15.95	20.23	32.75	

Tabel Anova

Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%	
Baris (PEG)	1	7.56	7.56	4.11	4.49	8.531	ns
Kolom (Umur)	3	1377.82	459.27	249.40	3.24	5.292	**
Interaksi	3	48.94	16.31	8.86	3.24	5.292	**
Galat	16	29.46	1.84				
Total	23	1463.78					

## Hasil Uji Lanjut

## 1. Perlakuan umur terhadap P0

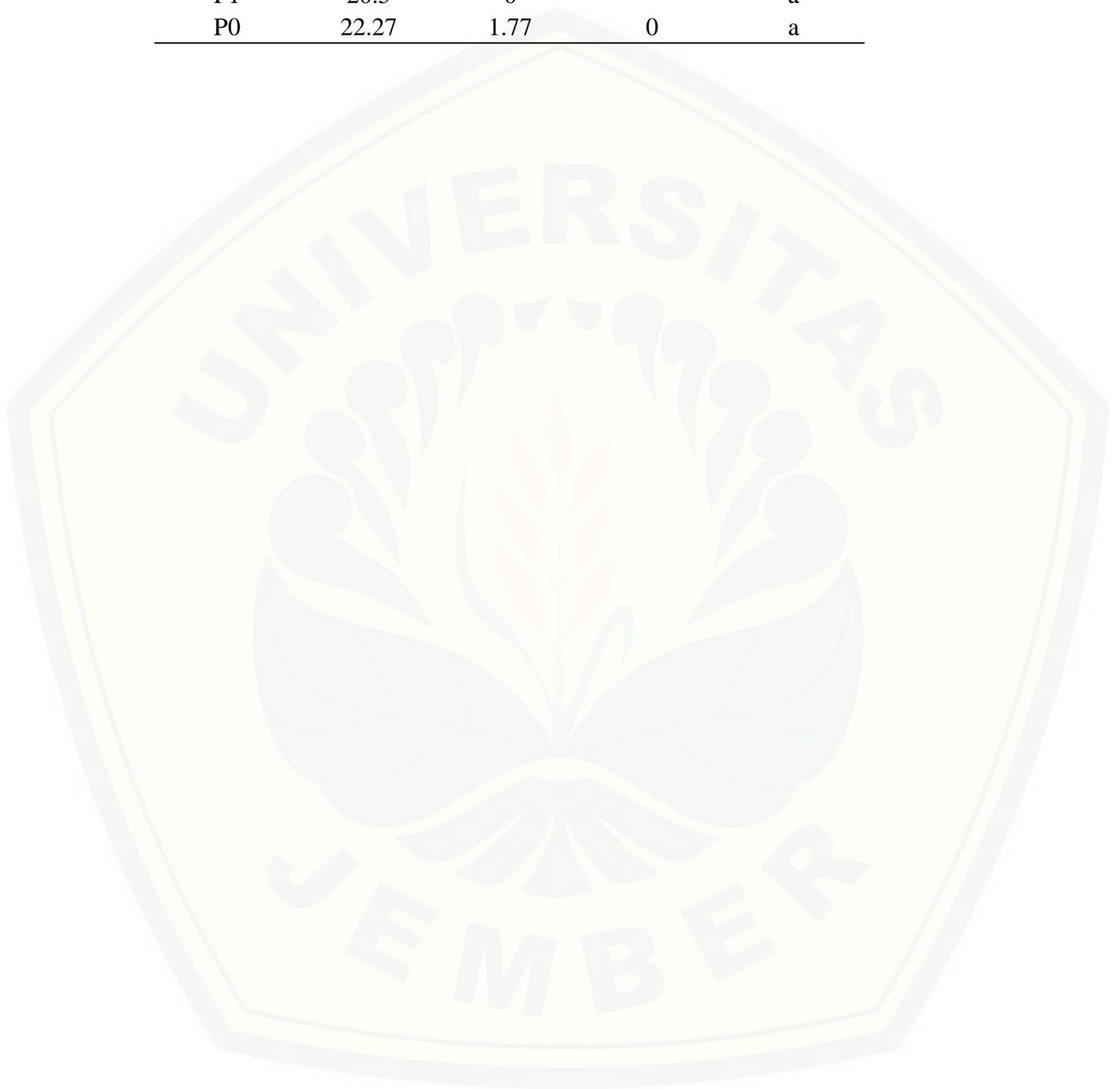
		U2	U1	U3	U4	Notasi
	Rata-rata	13.83	16.7	24.53	34.05	
U2	13.83	0				a
U1	16.7	2.87	0			b
U3	24.53	10.70	7.83	0		c
U4	34.05	20.22	17.35	9.52	0	d

## 2. Perlakuan umur terhadap P1

		U1	U2	U3	U4	Notasi
	Rata-rata	13.09	15.95	20.23	32.75	
U1	13.09	0				a
U2	15.95	2.86	0			b
U3	20.23	7.143	4.283	0		c
U4	32.75	19.66	16.8	12.517	0	d

## 3. Perlakuan P0 dan P1

	<b>Rata-rata</b>	<b>P1</b> <b>20.5</b>	<b>P0</b> <b>22.27</b>	<b>Notasi</b>
P1	20.5	0		a
P0	22.27	1.77	0	a



**Lampiran 5. Luas Daun Bibit Melinjo**

Perlakuan	Ulangan	U1	U2	U3	U4	Rata-rata
P0	1	15.24	19.20	22.31	23.14	19.74
	2	20.42	21.30	19.53	18.53	
	3	16.84	22.50	19.18	18.74	
P1	1	14.12	17.44	16.97	19.02	16.61
	2	18.33	17.33	17.57	12.50	
	3	15.86	16.97	16.63	16.63	
Rata-rata		16.80	19.12	18.70	18.09	

Tabel Anova

Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%	
Baris (PEG)	1	58.757	58.757	13.361	4.49	8.531	**
Kolom (Umur)	3	18.415	6.138	1.396	3.24	5.292	ns
Interaksi	3	6.505	2.168	0.493	3.24	5.292	ns
Galat	16	70.3645	4.398				
Total	23	154.041					

Hasil Uji Lanjut menggunakan Duncan 5%

	Rata-rata	P1	P0	Notasi
P1	16.61	0.00		a
P0	19.74	3.13	0	a

**Lampiran 6. Berat Basah Bibit Melinjo**

Perlakuan	Ulangan	U1	U2	U3	U4
P0	1	0.85	1.16	2.84	5.96
	2	0.87	1.68	5.67	10.21
	3	0.81	1.42	4.26	8.09
P1	1	0.82	1.16	3.40	8.55
	2	0.67	1.06	1.91	6.59
	3	0.74	1.11	2.66	7.57
Rata-rata		0.79	1.27	3.46	7.83

## Tabel Anova

Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%	
Baris (PEG)	1	2.391	2.391	2.359	4.49	8.531	ns
Kolom (umur)	3	185.657	61.886	61.044	3.24	5.292	**
Interaksi	3	2.006	0.669	0.659	3.24	5.292	ns
Galat	16	16.220	1.014				
Total	23	206.274					

## Hasil Uji Lanjut

	Rata-rata	U2	U1	U3	U4	Notasi
U2	0.79	0				a
U1	1.27	0.472	0			a
U3	3.46	2.66	2.19	0		b
U4	7.83	7.03	6.56	4.37	0	c

**Lampiran 7. Rasio Akar : Tajuk Bibit Melinjo**

<b>Perlakuan</b>	<b>U1</b>	<b>U2</b>	<b>U3</b>	<b>U4</b>
P0	49.12	24.73	51.06	81.71
	57.41	58.49	19.87	49.71
	40.68	42.71	28.74	60.10
	20.59	31.82	53.15	64.74
P1	27.42	21.84	15.76	96.72
	23.85	26.86	37.21	77.28
	36.51	34.41	34.30	71.71
<b>Rata-rata</b>	<b>36.51</b>	<b>34.41</b>	<b>34.30</b>	<b>71.71</b>

Tabel Anova

<b>Keragaman</b>	<b>db</b>	<b>JK</b>	<b>KT</b>	<b>F hitung</b>	<b>F tabel 5%</b>	<b>F tabel 1%</b>	
Baris (PEG)	1	187.657	187.657	0.982	4.49	8.531	ns
Kolom (Umur)	3	6058.463	2019.488	10.571	3.24	5.292	**
Interaksi	3	1481.203	493.735	2.584	3.24	5.292	ns
Galat	16	3056.729	191.046				
Total	23	10784.05					

Hasil Uji Lanjut

	<b>Rata-rata</b>	<b>U3</b>	<b>U2</b>	<b>U1</b>	<b>U4</b>	<b>Notasi</b>
		<b>34.30</b>	<b>34.41</b>	<b>36.51</b>	<b>71.71</b>	
U3	34.30	0				a
U2	34.41	0.108	0			a
U1	36.51	2.21	2.10	0		a
U4	71.71	37.41	37.30	35.20	0	b

**Lampiran 8. Panjang Akar Bibit Melinjo**

<b>Perlakuan</b>	<b>U1</b>	<b>U2</b>	<b>U3</b>	<b>U4</b>	<b>Rata-rata</b>
P0	4.3	13.2	8.3	21	10.29
	4.6	7	10	14.2	
	4.1	10.1	9.1	17.6	
	2.5	4.3	9	12.7	
P1	3.2	5.4	3.2	11	6.41
	2.85	4.85	6.1	11.85	
	Rata-rata	3.6	7.48	7.62	

Tabel ANOVA

<b>Keragaman</b>	<b>db</b>	<b>JK</b>	<b>KT</b>	<b>F hitung</b>	<b>F tabel 5%</b>	<b>F tabel 1%</b>	
baris (PEG)	1	90.29	90.29	22.92	4.49	8.53	**
kolom (umur)	3	387.51	129.17	32.79	3.24	5.29	**
interaksi	3	17.75	5.92	1.50	3.24	5.29	ns
galat	16	63.03	3.94				
Total	23	558.58					

## Hasil Uji Lanjut

## 1. Perlakuan PEG

	<b>Rata-rata</b>	<b>P1</b>	<b>P0</b>	<b>Notasi</b>
P1	6.41	0		a
P0	10.29	3.88	0	b

## 2. Perlakuan Umur

	<b>Rata-rata</b>	<b>U1</b>	<b>U2</b>	<b>U3</b>	<b>U4</b>	<b>Notasi</b>
U1	3.6	0				a
U2	7.48	3.88	0			b
U3	7.62	4.02	0.14	0		b
U4	14.73	11.13	7.25	7.11	0	c