

Pengaruh Cekaman Aluminium terhadap Kandungan Asam Organik dalam Kalus dan Pinak Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Wening Enggarini¹ dan Erly Marwani²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3A Bogor 16111

²Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa 10, Bandung

ABSTRACT

The Effects of Aluminum Stress on Organic Acid Content of *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Intan Callus and Plantlet. Wening Enggarini and Erly Marwani. The purpose of this research was to evaluate the effects of Al stress on citric, malic and oxalic acid content of *L. esculentum* cv. Intan callus and plantlet, also aluminum content of *L. esculentum* plantlet. Callus was induced from cotyledone of *L. esculentum* on Murashige & Skoog (MS) media containing 10^{-7} M NAA and 10^{-6} kinetin. The callus was then transferred step wisely at 3 weeks interval to media containing 220, 275, 330, 385, 440, 550, 825, and 1100 μ M AlCl_3 . The callus cultures on the control media and media with the addition of 550 μ M AlCl_3 were able to regenerate and produce shoots after 8 passages of subculture. The shoots from media with the addition of 550 μ M AlCl_3 were transferred into the media with addition of 825 μ M AlCl_3 , then to the media with 1100 μ M AlCl_3 . The High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) analysis showed that Al stress callus and plantlets contained malic acid, but no citric and oxalic acid. The content of malic acid in callus decreased with increasing AlCl_3 concentration from 0 to 385 μ M. On the other hand, the content of malic acid in callus increased with increasing AlCl_3 concentration from 440 μ M to 1100 μ M. Similarly, the content of malic acid in root increased with increasing concentration of AlCl_3 from 550 μ M to 1100 μ M. The result of Neutron Activation Analysis showed that Al content in root decreased as the amount of AlCl_3 increased in the media. These results suggested that *L. esculentum* callus and plantlet respond to the Al stress by producing higher amount of malic acid.

Key words: Aluminum, organic acid, *Lycopersicon esculentum*.

PENDAHULUAN

Budi daya tanaman tomat di tanah masam sebagai usaha ekstensifikasi selalu mengalami hambatan karena kandungan Al yang tinggi mengganggu pertumbuhannya. Gejala-gejala yang terlihat pada tumbuhan yang keracunan Al antara lain pertumbuhan akar terhambat, terjadi klorosis, defisiensi nutrisi, dan tanaman menjadi kerdil.

Untuk mengatasi masalah toksisitas Al pada tanah masam dapat diarahkan pada pengembangan varietas tanaman yang mempunyai sifat toleran terhadap Al. Tanaman toleran terhadap Al dapat dihasilkan melalui metode pemuliaan secara konvensional atau dengan pendekatan secara manipulasi genetik. Oleh karena itu, informasi mengenai faktor-faktor yang berkaitan dengan toleransi tanaman terhadap Al sangat dibutuhkan.

Asam organik diketahui berperan dalam mekanisme ketahanan tumbuhan terhadap cekaman Al. Terdapat dua cara tumbuhan mengatasi cekaman Al tersebut, yaitu dengan mekanisme eksternal dan mekanisme internal. Pada mekanisme eksternal, tumbuhan mencegah Al masuk ke dalam jaringan antara lain dengan mengeksudasi asam organik dari akar yang dapat berikatan dengan Al di rizosfer. Asam organik tersebut dapat membentuk kompleks dengan Al di rizosfer sehingga tidak bersifat racun bagi tumbuhan (Ryan *et al.* 2001). Mekanisme kedua adalah secara internal di mana tumbuhan dapat mentolerir kehadiran Al di dalam jaringan dengan cara menghasilkan asam organik atau ligan organik yang dapat berikatan dengan Al sehingga terbentuk kompleks yang tidak bersifat racun (Watanabe dan Osaki 2002). Pada tumbuhan telah diketahui beberapa jenis asam organik yang berperan dalam mekanisme toleransi terhadap cekaman Al secara eksternal. Contohnya, asam sitrat yang dieksudasi tanaman buncis (Miyasaka *et al.* 1991); asam malat dieksudasi gandum (Delhaize *et al.* 1993); serta asam sitrat dan malat yang dieksudasi jagung (Kollmeier *et al.* 2001).

Saat ini penelitian yang meneliti tentang pengaruh cekaman Al pada eksudasi asam organik masih terbatas pada beberapa tanaman tertentu. Salah satu tanaman yang potensial ditanam di tanah masam adalah tanaman tomat. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh cekaman Al tinggi terhadap kandungan asam sitrat, malat, dan oksalat dalam kalus dan pinak tomat kultivar Intan. Di samping itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui kandungan Al dalam pinak tomat kultivar Intan yang diberi cekaman Al.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Departemen Biologi ITB mulai Oktober 2003-Februari 2005. Bahan tanaman yang digunakan adalah biji tomat kultivar Intan diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa) Lembang.

Induksi Kalus

Kotiledon dari kecambah tomat yang berumur 7 hari digunakan sebagai bahan eksplan untuk induksi kalus. Kotiledon dikultur pada medium dasar (MD) berupa medium Murashige & Skoog (MS) yang mengandung 10^{-7} M NAA dan 10^{-6} M kinetin (Faisal 2003). Kultur kemudian disimpan di ruang kultur dengan penyinaran lampu TL selama 24 jam serta suhu ruang 25°C . Setelah kalus muncul, dilakukan 2 kali subkultur masing-masing setiap 3 minggu.

Perlakuan Cekaman Al

Massa kalus yang dihasilkan dari induksi kalus di atas selanjutnya ditanam pada medium MD yang mengandung $220 \mu\text{M AlCl}_3$. Setelah 3 minggu, kalus dipindahkan secara bertahap dari konsentrasi AlCl_3 275, 330, 385, 440, 550, 825 hingga $1100 \mu\text{M}$. Sebagai kontrol, kalus ditanam pada medium kontrol, yaitu medium MD tanpa penambahan AlCl_3 . Tunas yang tumbuh dari kalus pada medium yang mengandung AlCl_3 sebagian disubkultur dan sisanya dipindahkan secara berturut-turut ke medium dengan konsentrasi AlCl_3 yang lebih tinggi. Sementara itu, tunas pada medium kontrol tetap disubkultur ke medium yang sama. Tunas yang telah panjang pada medium kontrol dan perlakuan dipotong di bagian tunas apikal, kemudian disubkultur ke medium yang sama sehingga dihasilkan pinak tomat.

Analisis Kandungan Asam Organik

Kalus dan pinak tomat yang berumur 3 minggu masing-masing dikeringkan lalu diekstraksi dengan metanol 70% yang mengandung asam asetat 1% (Yahya *et al.* 2001). Ekstrak tersebut lalu dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan fasa gerak berupa metanol : air. Elusi dideteksi dengan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm. Analisis kualitatif untuk mengetahui ada tidaknya asam malat, asam sitrat, dan asam oksalat dalam sampel dilakukan dengan membandingkan waktu retensi sampel dengan waktu retensi larutan baku ketiga asam organik. Apabila dalam sampel ditemukan senyawa dengan waktu retensi yang sama dengan larutan baku asam sitrat, malat, dan oksalat, maka sampel tersebut mengandung asam-asam organik tersebut.

Larutan baku asam sitrat, malat dan oksalat disiapkan dengan melarutkan masing-masing sebanyak 300 mg asam-asam organik tersebut dalam 10 ml metanol 70% yang mengandung asam asetat 1% sehingga diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 30.000 ppm. Analisis kuantitatif untuk mengetahui kadar asam organik dalam sampel dilakukan dengan cara mengkonversi luas area sampel dengan luas area larutan baku yang telah diketahui konsentrasinya.

Analisis Al

Akar, batang, dan daun pinak tomat dikeringkan dalam oven. Bahan-bahan yang telah kering kemudian digerus sampai halus dan siap dianalisis dengan Neutron Activation Analysis di Badan Tenaga Atom Nasional (Batan) Bandung. Sampel dimasukkan ke dalam reaktor nuklir, lalu ditembak dengan neutron-neutron yang mengakibatkan elemen-elemen dalam sampel teraktivasi. Tiap elemen yang teraktivasi memancarkan radiasi dengan energi tertentu yang telah diketahui. Kadar Al dalam sampel ditentukan dengan mengkonversi energi radiasi Al dalam sampel dengan energi radiasi Al dalam bahan yang telah diketahui jumlah kadar Al.

Analisis Statistik

Penelitian ini disusun dalam rancangan acak lengkap dengan 8 perlakuan dan 3 ulangan. Data-data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian (ANAVA). Jika terdapat pengaruh cekaman Al yang berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan Duncan's Multiple Range Test pada tingkat kepercayaan 95%. Analisis statistik dilakukan dengan program statistik SPSS 11.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus dan Perlakuan Cekaman Al

Eksplan berupa kotiledon yang dikultur pada medium MS dengan penambahan 10^{-7} M NAA dan 10^{-6} M kinetin mampu membentuk kalus pada akhir minggu ke-2. Tekstur kalus ini kompak dan memperlihatkan warna coklat muda (Gambar 1A). Warna kalus berubah menjadi coklat kehitaman ketika dipindahkan ke medium yang mengandung $220 \mu\text{M AlCl}_3$ (Gambar 1B). Hal ini diduga karena pemberian Al yang tinggi mengakibatkan keracunan Al pada kalus. Secara umum kalus melakukan mekanisme pertahanan terhadap cekaman, salah satunya dengan pembentukan senyawa fenol yang biasanya diikuti dengan perubahan warna kalus menjadi coklat (George dan Sherrington 1995).

Regenerasi Tunas dan Akar

Tunas yang tumbuh pada medium kontrol terjadi setelah subkultur sebanyak 8 kali (Gambar 1C), demikian pula yang terjadi pada medium yang mengandung $550 \mu\text{M AlCl}_3$ (Gambar 1D). Tunas tomat pada medium kontrol (P0), medium yang mengandung $550 \mu\text{M}$ (P550), $825 \mu\text{M}$ (P825), dan $1100 \mu\text{M AlCl}_3$ (P1100) mengalami pemanjangan, lalu membentuk akar pada akhir minggu ke-3 (Gambar 1E-H). Pembentukan akar terjadi tanpa peningkatan konsentrasi auksin dalam medium. Hal yang serupa juga dilaporkan oleh Sutjahjo *et al.* (2004) bahwa pembentukan akar pada tunas tomat kultivar San Marino dan Ratna terjadi tanpa peningkatan konsentrasi auksin. Hal ini diduga karena komposisi hormon endogen dalam tunas tersebut telah memenuhi kebutuhan auksin yang diperlukan untuk pembentukan akar.

Kandungan Asam-asam Organik dalam Kalus dan Pinak Tomat

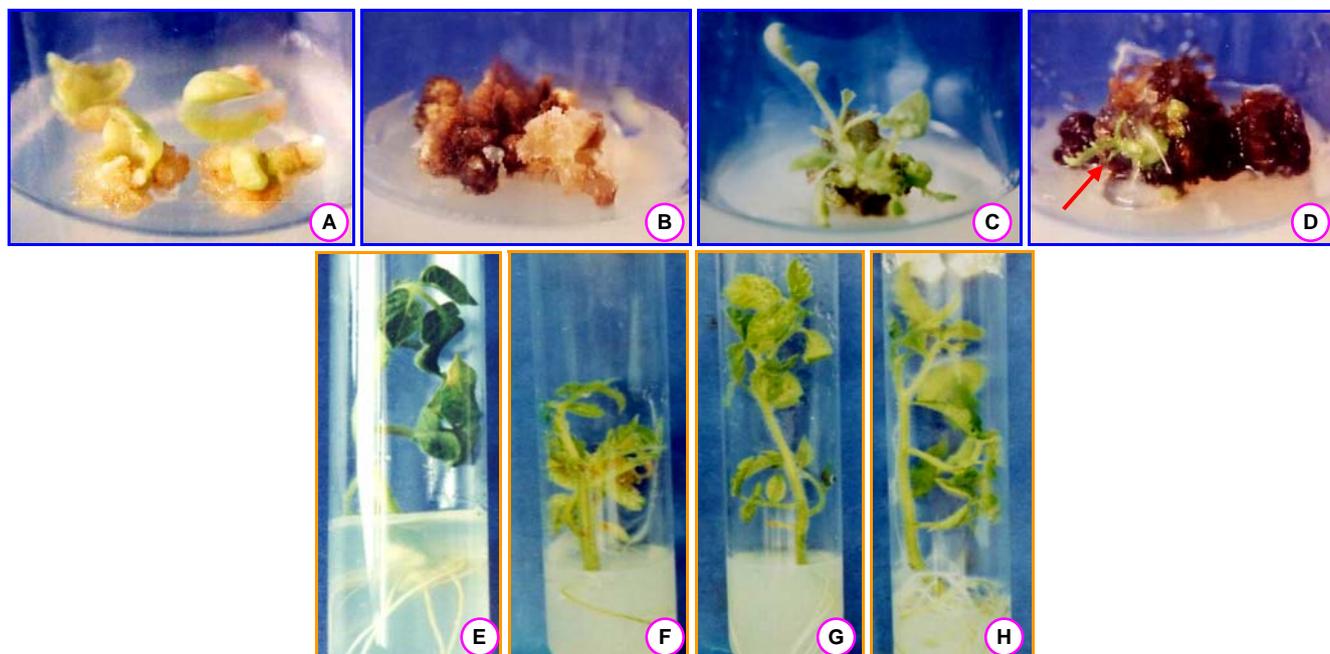
Hasil analisis asam-asam organik menunjukkan waktu retensi larutan baku asam malat adalah 9,572 menit, sedangkan larutan baku asam sitrat dan asam oksalat masing-masing, yaitu 6,994 menit dan 6,845 menit. Pada kromatogram sampel terlihat bahwa di antara senyawa-senyawa yang terdeteksi dalam sampel kalus dan pinak tomat, tidak ada senyawa yang memiliki waktu retensi yang sama atau mendekati

dengan waktu retensi larutan baku asam sitrat dan oksalat, hanya asam malat yang terdeteksi. Berdasarkan hasil penelitian ini, selanjutnya analisis asam organik dalam kalus dan pinak tomat hanya dilakukan terhadap asam malat saja.

Kandungan Asam Malat dalam Kalus Tomat

Jumlah asam malat dalam kalus berfluktuasi sejalan dengan peningkatan konsentrasi AlCl_3 pada medium (Gambar 2). Kandungan asam malat pada $220 \mu\text{M AlCl}_3$ lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, sedangkan pada $275\text{-}385 \mu\text{M AlCl}_3$ lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Pada $440 \mu\text{M}$ hingga $1100 \mu\text{M AlCl}_3$ terjadi peningkatan kandungan asam malat.

Pada pemberian $220 \mu\text{M AlCl}_3$ kandungan asam malat tidak berbeda nyata dengan kontrol, artinya konsentrasi AlCl_3 sebesar itu tidak menyebabkan gangguan terhadap sel-sel sehingga tidak menimbulkan respon yang berbeda dengan kontrol. Kandungan asam malat menurun pada pemberian $275 \mu\text{M}$ sampai dengan $385 \mu\text{M AlCl}_3$ (Gambar 2). Diduga ini merupakan reaksi terhadap cekaman Al yang didasari oleh pernyataan Larcher (1995) bahwa reaksi organisme terhadap cekaman terjadi dalam beberapa tahap. Pada tahap awal (*alarm phase*) ditunjukkan dengan proses katabolisme dalam sel berlangsung lebih dominan daripada anabolisme. Jika cekaman terus berlangsung, sel melakukan proses perbaikan



Gambar 1. Kalus tomat berumur 3 minggu pada medium kontrol/tanpa Al (A) dan medium yang mengandung $220 \mu\text{M AlCl}_3$ (B); regenerasi tunas adventif pada medium kontrol (C) dan medium yang mengandung $550 \mu\text{M AlCl}_3$ (D); pembentukan akar pada tunas tomat setelah 3 minggu, P0 (E), P550 (F), P825 (G), dan P1100 (H).

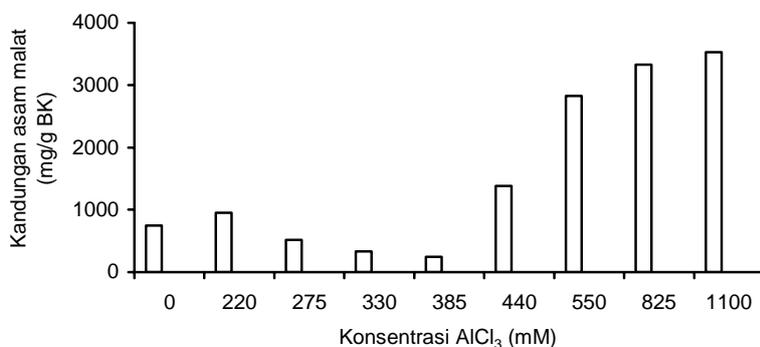
dengan mensintesis protein atau substansi yang berperan dalam proteksi sel sehingga terjadi peningkatan fungsi sel. Keadaan ini disebut *restitution phase*. Dalam penelitian ini, pemberian AlCl_3 275 μM hingga 385 μM diduga menyebabkan katabolisme asam malat sehingga kandungan asam malat lebih rendah daripada kontrol. Sementara itu, kandungan asam malat pada pemberian AlCl_3 440 μM sampai dengan 1100 μM meningkat. Hal ini menunjukkan adanya sintesis asam malat sebagai substansi yang berperan dalam proteksi sel akibat cekaman Al yang diberikan terus menerus.

Peningkatan kandungan asam malat ini juga merupakan respon kalus yang memperlihatkan peningkatan kemampuan adaptasi kalus pada konsentrasi AlCl_3 tinggi. Pada tumbuhan yang telah diketahui toleran terhadap Al peningkatan kandungan asam organik umum terjadi diduga karena Al menginduksi sintesis enzim-enzim yang berperan dalam biosintesis asam organik sehingga asam organik yang dihasilkan meningkat (Ma *et al.* 2001). Adaptasi yang terjadi pada kalus tomat ini termasuk aklimasi. Aklimasi merupakan peningkatan kemampuan kultur dalam menghadapi cekaman lingkungan yang diberikan secara terus menerus kepada kultur. Peningkatan ini kemungkinan disebabkan perubahan ekspresi gen pada kultur (Taiz dan Zeiger 2002).

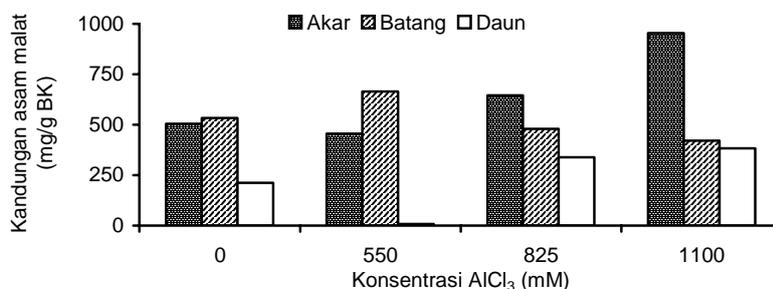
Kandungan Asam Malat dalam Pinak Tomat

Kandungan asam malat pada akar meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi AlCl_3 pada medium, dengan kandungan asam malat tertinggi pada akar P1100, yaitu 953,4608 mg/g BK. Sementara itu, dalam batang cenderung menurun sejalan dengan peningkatan konsentrasi AlCl_3 pada medium (Gambar 3).

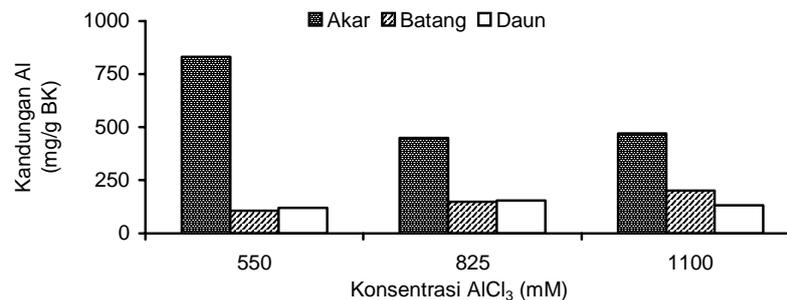
Kandungan asam malat dalam akar pinak meningkat diduga berkaitan dengan kemampuan pinak mengatasi cekaman Al. Hal ini pernah dilaporkan pada tanaman jagung kultivar SA3. Peningkatan kandungan asam malat pada jagung dapat meningkatkan eksudasi asam malat ke medium, sehingga kemampuan tanaman dalam mentolerir cekaman Al pada medium juga meningkat (Pineros *et al.* 2002). Terdapat dua faktor yang diduga menyebabkan terjadinya peningkatan kandungan asam organik dalam akar tumbuhan yang tercekam Al. Faktor yang pertama, yaitu Al dapat mengaktifkan kerja enzim-enzim yang berperan dalam biosintesis asam organik (Li *et al.* 2000), dan yang kedua, adanya asam organik yang ditransportasikan dari batang menuju akar (Matsumoto *et al.* 2003). Pada penelitian ini peningkatan kandungan asam malat dalam akar pinak tomat diduga terjadi karena faktor yang kedua, yaitu adanya transportasi asam malat dari batang menuju akar. Hal ini terlihat dari kandungan asam malat pada batang cenderung mengalami penurunan, sedangkan pada akar meningkat sejalan



Gambar 2. Kandungan asam malat dalam kalus berumur 3 minggu pada berbagai konsentrasi AlCl_3 .



Gambar 3. Kandungan asam malat dalam akar, batang, dan daun pinak tomat berumur 3 minggu pada berbagai konsentrasi AlCl_3 .



Gambar 4. Kandungan Al dalam akar, batang, dan daun pinak tomat berumur 3 minggu pada berbagai konsentrasi AlCl₃.

dengan peningkatan konsentrasi AlCl₃ pada medium (Gambar 3). Jadi akar mendapatkan asam malat dari batang, yang merupakan penyedia asam organik.

Kandungan Al dalam Pinak Tomat

Kandungan Al dalam akar lebih tinggi daripada dalam daun dan batang (Gambar 4). Kandungan Al dalam akar cenderung menurun sejalan dengan peningkatan konsentrasi AlCl₃ pada medium.

Penurunan kandungan Al dalam akar (Gambar 4) diduga berkaitan dengan kandungan asam malat dalam akar yang meningkat (Gambar 3). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, peningkatan kandungan asam organik dalam akar dapat menyebabkan eksudasi asam organik tersebut meningkat. Contohnya pada tanaman jagung (Pinoso *et al.* 2002). Peningkatan eksudasi asam organik mengakibatkan jumlah asam organik di rizosfer meningkat. Jumlah Al yang terikat dengan asam organik di rizosfer lebih banyak daripada Al yang masuk ke dalam tanaman. Hal ini dapat menurunkan konsentrasi Al yang bersifat racun di rizosfer akar ataupun akumulasi Al yang toksik dalam sitoplasma akar (Ma *et al.* 2001).

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa cekaman Al yang diberikan pada kalus dan pinak tomat menimbulkan respon berupa peningkatan kandungan asam malat pada kalus dan akar pinak tomat. Peningkatan kandungan asam malat dalam akar pinak tomat ternyata berpengaruh pada jumlah Al yang terserap oleh akar sehingga kandungan Al dalam akar pinak menurun. Respon tersebut kemungkinan berkaitan dengan mekanisme toleransi terhadap Al pada tanaman tomat kultivar Intan. Untuk memahami mekanisme toleransi tersebut dengan lebih jelas, diperlukan penelitian lebih lanjut meliputi jumlah asam malat yang dieksudasi ke medium dan aktivitas enzim-enzim yang berperan dalam biosintesis asam malat.

DAFTAR PUSTAKA

- Delhaize, E., P.R. Ryan, and P.J. Randall. 1993.** Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 10:695-702.
- Faisal, A. 2003.** Seleksi *in vitro* dan penentuan kandungan senyawa besi pada kalus tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) toleran terhadap cekaman besi. Skripsi Program Sarjana, ITB. Bandung.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1995.** Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Inggris. p. 10-12.
- Kollmeier, M., P. Dietrich, C.S. Bauer, W.J. Horst, and R. Hedrich. 2001.** Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiol.* 126:397-410.
- Larcher, W. 1995.** Physiological plant ecology. 3rd Edition. Springer-Verlag. Germany. p. 322-334.
- Li, X.F., J.F. Ma, and H. Matsumoto. 2000.** Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol.* 123:1537-1543.
- Ma, J.F., P.R. Ryan, and E. Delhaize. 2001.** Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Sci.* 6(6):273-279.
- Matsumoto, H., Z.M. Yang, J.F. You, and H. Nian. 2003.** The physiological mechanism of aluminum tolerance in *Glycine max* L. *Plant Physiol.* 6:237-261.
- Miyasaka, S.C., J.G. Buta, R.K. Howell, and C.D. Foy. 1991.** Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96:737-743.
- Pinoso, M.A., J.V. Magalhaes, V.M.A. Carvalho, and L.V. Kochian. 2002.** The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in Maize. *Plant Physiol.* 129:1194-1206.
- Ryan, P.R., E. Delhaize, and D.L. Jones. 2001.** Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Plant Mol. Biol.* 52:527-560.
- Sutjahjo, S.H., A. Ernawati, dan O. Hancock. 2004.** Seleksi *in vitro* untuk toleransi terhadap cekaman aluminium

pada varian somaklon dua kultivar tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Zuriat 15(1):77-85.

Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. Plant physiology, 3rd Edition. Sinauer Associated. USA. p. 232-236.

Watanabe, T. and M. Osaki. 2002. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils. Communication Soil Science Plant Analysis 33:1247-1260.

Yahya, S., Sudarsono, dan B.A. Sirait. 2001. Evaluasi karakter fisiologi kedelai toleran aluminium hasil penapisan secara *in vitro*. Jurnal Penelitian Pertanian 20(1): 40-47.
