



UJI TOLERANSI TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L.) TERHADAP CEKAMAN KADMIUM (Cd), TIMBAL (Pb), DAN TEMBAGA (Cu) PADA KULTUR CAIR

Siti Rosidah¹✉, Yustinus U Anggraito², Krispinus K Pukan³

Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Diterima Juli 2014

Disetujui Agustus 2014

Dipublikasikan

November 2014

Keywords:

Nicotiana tabacum L.

Uji toleransi

Tembaga (Cu)

Kadmium (Cd)

Timbal (Pb)

Kultur cair

Abstrak

Penelitian ini menyelidiki respon fisiologis, anatomis, dan morfologis tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap cekaman logam berat: tembaga (Cu), kadmium (Cd), dan timbal (Pb). Uji dilakukan pada bulan Januari-April 2014. Sampel yang digunakan adalah tembakau umur 3-4 minggu yang dikedambahkan secara *in vitro* dan kemudian dipapar logam berat selama 14 hari. Desain penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap dengan satu faktor: yaitu konsentrasi logam Cu (0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M & 200 μ M), Cd (0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M & 300 μ M), dan Pb (0 μ M, 5 μ M, 20 μ M, 50 μ M & 100 μ M). Parameter yang digunakan antara lain: pertambahan panjang akar, pertambahan jumlah akar, akumulasi logam dalam akar, lokalisasi penimbunan dalam akar, dan warna daun. Bertambahnya konsentrasi logam menghambat pertumbuhan akar dan menyebabkan deposit logam pada jaringan akar dan gejala klorosis. Hasil uji *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS) menunjukkan semakin besar konsentrasi semakin banyak akumulasi logam pada jaringan akar. Akumulasi Cd pada konsentrasi 200 μ M lebih besar dibanding pada konsentrasi 300 μ M. Hal ini menunjukkan ada faktor lain selain konsentrasi seperti respon internal individu dan gangguan permeabilitas. Analisis kualitatif membuktikan bahwa cekaman Cu tidak berpengaruh signifikan terhadap warna daun, sedangkan pada cekaman Cd (100, 150 dan 200 μ M) dan Pb (150 μ M) daun mengalami klorosis. Secara umum pengaruh konsentrasi logam berat yang rendah seperti 50 μ M Cu, 50 μ M Cd, dan 5 μ M Pb terhadap parameter fisiologis, anatomis, dan morfologis tidak berbeda nyata pada taraf 5 % dengan kontrol. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa tembakau mampu mentoleransi cekaman logam pada konsentrasi yang rendah.

Abstract

*This research investigated physiological, anatomical, and morphological responses of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) stressed by heavy metals: copper (Cu), cadmium (Cd), and lead (Pb). The experiment was conducted from January-April 2014. The samples used are three-four weeks tobaccos germinated by *in vitro* then were exposed to heavy metals for 14 days. This study used completed random design with single factor: concentrations of Cu (0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M & 200 μ M), Cd (0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M & 300 μ M), and Pb (0 μ M, 5 μ M, 20 μ M, 50 μ M & 100 μ M). Further, stress response is analyzed based on several parameters includes root elongation, root number, metal accumulation and localization in root, and leaf color. The increased metals had caused growth inhibition, metal deposit in root tissue, and chlorosis symptoms. Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) results showed that higher concentration will cause root tissue accumulate more metals. Yet 200 μ M of Cd accumulated more than 300 μ M Cd, so it could be suggested that there are other factors than concentration in determining metal absorption such as internal individual response and membrane permeability disturbance. In other hand, qualitative analysis proved that chlorosis was not found in Cu treatment but consistently notified in high concentrations of Cd (100 μ M up to 200 μ M) and Pb (100 μ M). However, the influence of lower metals concentration such as 50 μ M Cu, 50 μ M Cd and 5 μ M Pb and control treatment were not significantly different at the level of 5% in physiological, anatomical, and morphological responses. Therefore, it can be concluded that tobacco was capable to tolerate low concentration of metal stress.*

© 2014 Universitas Negeri Semarang

ISSN 2252-6889

✉ Alamat korespondensi:

Gedung D6 Lt.1, Jl. Raya Sekaran,

Gunungpati, Semarang, Indonesia 50229

E-mail: sitirosidahedu@gmail.com

PENDAHULUAN

Pencemaran logam berat seperti Cu, Cd, dan Pb banyak ditemukan pada lahan bekas pertambangan (Sabtanto & Suhandi 2005). Berbagai upaya adaptasi dan remediasi yang telah dilakukan antara lain penggunaan tanaman sebagai media pencucian polutan dalam tanah (Hidayati 2005). Tidak semua spesies memiliki kemampuan mengkelat logam, oleh karena itu upaya penanggulangan cekaman logam diarahkan kepada teknologi transformasi genetik yang umumnya menggunakan tanaman model. Tembakau adalah tanaman model yang umumnya digunakan sebagai sampel dalam penelitian transformasi genetik. Berbagai penelitian yang telah menggunakan tembakau sebagai sampel antara lain: Luo *et al.* (2006), Anggraito *et al.* (2012), Maheshwari & Kovalchuk (2012) dan Zhang *et al.* (2013). Studi mengenai logam berat seperti Cu, Cd, dan Pb mulai berkembang dengan menggunakan tanaman model.

Toksisitas logam berat seperti Cu, Cd dan Pb secara umum menyebabkan efek negatif pada tumbuhan. Cekaman Cu dapat menyebabkan terganggunya penyerapan mineral esensial dan pembelahan sel, rusaknya jaringan dinding sel, terhambatnya pertumbuhan akar dan tunas dan polimerisasi lignin (Fry *et al.* 2002; Mahmood *et al.* 2007; Quiroga *et al.* 2000; Alaoui-Sossé *et al.* 2004 & Jiang *et al.* 2001). Sedangkan logam Cd menghambat pertumbuhan dengan memblokir hara Ca, mengganggu ekspansi dan pembelahan sel serta gangguan fotosintesis (Kurtyka *et al.* 2008; Poschenrieder *et al.* 1989; Zou *et al.* (2012). Cekaman Pb terbukti menyebabkan menurunnya

pertumbuhan akar, rusaknya dinding sel, terganggunya pembelahan sel (Kopittke *et al.* 2007; Ghelich *et al.* 2013; Kumar & Tripathi 2008).

Tanaman memiliki beberapa mekanisme pertahanan terhadap cekaman logam berat. Pertahanan ini ditunjukkan dengan tidak terganggunya pertumbuhan tanaman seperti pertumbuhan akar, metabolisme fotosintesis dan lainnya. Beberapa studi sebelumnya telah merumuskan berbagai mekanisme pertahanan tumbuhan antara lain; menurut Cobbet (2000) adalah 1) pengkelatan logam berat yang dilakukan dengan produksi peptida pengkelat logam seperti fitokelatin dan metalothionein, 2) immobilisasi, dan 3) kompartementalisasi ion logam dalam vakuola.

Analisis respon tembakau terhadap cekaman logam berat telah dilakukan pada studi sebelumnya seperti Gori *et al.* (1998) dan Yoshihara *et al.* (2006). Pada penelitian ini dilakukan uji *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS) untuk mengetahui akumulasi logam berat dalam jaringan akar. Uji serupa juga dilakukan oleh Szöllösi *et al.* (2011) untuk menguji kandungan Cu dalam *Brassica juncea*. Parameter lain yang umum digunakan untuk mengetahui respon tumbuhan terhadap cekaman antara lain pertumbuhan akar, lokalisasi penimbunan dalam akar dan warna daun. Beberapa metode telah digunakan untuk mengetahui lokalisasi logam pada jaringan tumbuhan secara mikroskopik, salah satunya dengan menggunakan metode pengirisan jaringan (Tistama *et al.* 2012; Lequex *et al.* 2010; Gori *et al.* 1998). Beberapa studi lain menggunakan pewarna tertentu antara lain: untuk

pewarna Cu digunakan *methylen blue*, *carbol fuchsin*, *propidium iodide* (Arduini *et al.* 1995; Jiang *et al.* 2001; Lequeux *et al.* 2010); perwarnaan Cd yaitu: *hematoxylin* (Ratheesh *et al.* 2010), *toluidine blue* (Schutzendubel *et al.* 2010); dan Pb dapat diwarnai dengan *Cystal violet* (Kopittke *et al.* 2007) dan asam rhodizonik dikombinasi dengan *dithizon* (Baranowska-Morek & Wierzbicka 2004). Analisis anatomis akumulasi logam dilihat berdasarkan timbunan perwarna pada zona atau organel tertentu.

Pertumbuhan akar dan warna daun umumnya menjadi parameter respon fisiologis tumbuhan akibat cekaman logam karena berhubungan erat dengan terganggunya aktivitas dalam sel dan metabolisme tumbuhan. Cekaman mineral umumnya mengakibatkan daun mengalami klorosis ataupun nekrosis (Wann 1930). Selain itu, terhambatnya pertumbuhan akar merupakan indikator besar tidaknya efek cekaman logam berat terhadap akar. Parameter pemanjangan akar telah digunakan pada beberapa studi seperti Arduini *et al.* (1995). Sedangkan klorosis merupakan salah satu gejala stres akibat cekaman logam berat. Analisis klorosis umumnya menggunakan spektroskopi cahaya (Ebbs & Uchil 2008) dan mikroanalisis menggunakan mikroskop elektron (Al khatib *et al.* 2011). Warna daun juga dapat dianalisis dengan index warna daun yang dikembangkan oleh IRRI (*International Rice Research Institute*). Penelitian ini menganalisis respon fisiologis, anatomis, dan morfologis tanaman tembakau terhadap cekaman logam berat Cu, Cd, dan Pb. Tujuan penelitian yaitu: mengetahui ada tidaknya pengaruh cekaman berbagai konsentrasi logam Cd, Pb, dan Cu terhadap pertumbuhan akar tembakau,

menganalisis tingkat kerusakan anatomi akar tembakau, akumulasi logam dan warna daun pada konsentrasi Cd, Pb, dan Cu yang berbeda dan mengetahui konsentrasi Pb, Cu, dan Cd yang mampu ditolerir oleh tembakau.

METODE PENELITIAN

Kultur in Vitro

Biji tembakau (*Nicotiana tabacum*) diambil dari Desa Tuksari Kabupaten Temanggung Provinsi Jawa Tengah, dikecambahkan secara *in vitro*. Di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) biji disterilisasi dengan alkohol 70% selama 5 menit, lalu direndam dalam 20% larutan *Bayclin* (5.25% NaClO) selama 5 menit. Biji dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali, selanjutnya ditanam dalam media Murashige Skoog (MS) padat tanpa tambahan hormon pengatur tumbuh dengan menggunakan alat tanam steril. Adapun komposisi media MS terdiri dari: CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, NH₄NO₃, KNO₃, hara mikro, vitamin, *myo*-inositol dan FeEDTA. Biji yang sudah ditanam diinkubasi dalam ruang gelap selama 2 hari kemudian dilanjutkan dengan pencahayaan lampu TL 40 watt dan suhu 26° C selama 3-4 minggu.

Kultur Cair

Media yang digunakan untuk kultur cair adalah media setengah MS. Tembakau umur 3-4 minggu siap dipindahkan ke dalam kultur cair untuk proses aklimatisasi selama 3 hari. Setelah proses aklimatisasi, semaian tembakau dipindah ke dalam media cair yang mengandung logam. Konsentrasi masing-masing logam adalah: logam berat Cu (0 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM & 200 µM), logam Cd (0 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM &

300 μM), dan Pb (0 μM , 5 μM , 20 μM , 50 μM & 100 μM). Kadar pH kultur disesuaikan dengan jenis logam Cu (5.1-5.6); Cd (5.8); dan Pb (5.5-5.7). Pemaparan dilakukan selama 14 hari dan pengamatan pertumbuhan panjang dan jumlah akar dilaksanakan sebanyak 4 kali pengamatan selama masa pemaparan. Hasil pengamatan selanjutnya secara kualitatif dianalisis dengan uji Anava satu jalan menggunakan aplikasi SPSS Ver.16.

Akumulasi dan Lokalisasi Logam dalam Jaringan

Penentuan akumulasi logam berat dalam akar menggunakan analisis *Atomic absorption spectrophotometry* (AAS) dengan 3 kali ulangan masing-masing konsentrasi logam. Satuan akumulasi ditunjukkan dengan $\mu\text{g}/\text{gram}$ berat sampel. Sedangkan analisis lokalisasi deposit logam dalam jaringan akar dilakukan dengan pengamatan mikroskopis. Metode pembuatan preparat yang digunakan adalah metode *whole mount* dengan memotong ujung akar sepanjang 5 mm kemudian direndam dalam larutan pewarna selama 10 menit. Adapun larutan pewarna yang digunakan adalah sebagai berikut: *hematoxylin* (Ratheesh *et al.* 2010) untuk cekaman Cd, *methyl blue* untuk cekaman Cu (Arduini *et al.* 1995) dan *crystal violet* untuk Pb (Kopittke *et al.* 2007). Preparat kemudian diamati dibawah mikroskop dan dilakukan pengambilan gambar anatomi akar.

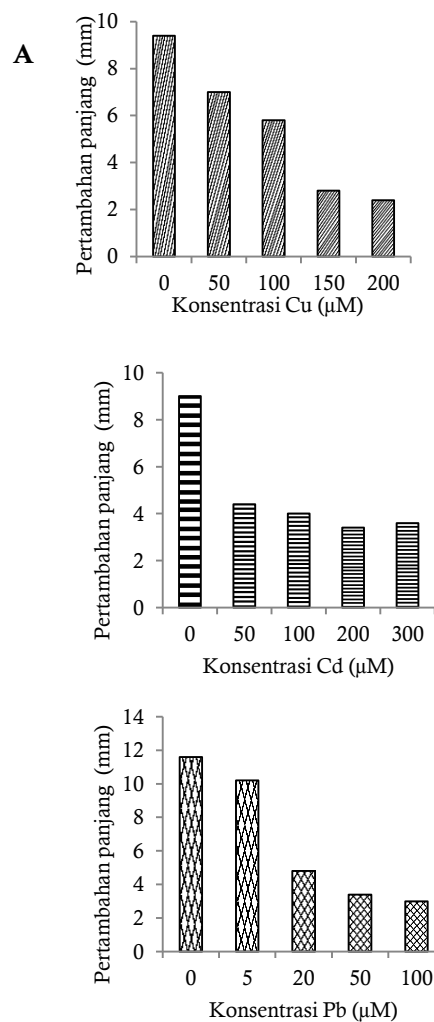
Analisis Warna Daun

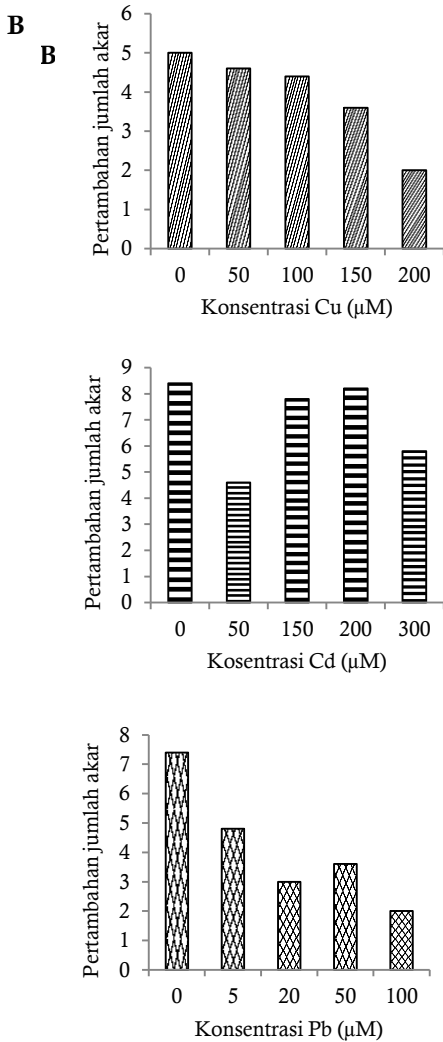
Analisis warna daun dilakukan pada akhir masa pemaparan dengan menggunakan *leaf color index*. Semakin rendah nilai indeks warna daun maka semakin rendah kandungan klorofil di dalamnya.

HASIL PENELITIAN

Hambatan Pertumbuhan Akar

Setelah dipapar selama 14 hari, didapatkan hasil bahwa cekaman Cu, Cd dan Pb secara signifikan menyebabkan penurunan pemanjangan akar (Gambar 1A). Pada konsentrasi rendah tidak ditemukan perbedaan nyata dengan kontrol, seperti pada konsentrasi 50 μM dan 100 μM Cu dan 5 μM Pb. Pada parameter jumlah akar cekaman Cu dan Cd tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (Gambar 1B). Cekaman Pb berpengaruh dalam penghambatan pemanjangan akar dan pertumbuhan akar baru.





Gambar 1. Hasil pengamatan kuantitatif dan dan kualitatif. A. Rerata pertambahan panjang akar *N. tabacum* L. pada cekaman Cu, Cd, dan Pb. B. Rerata pertambahan jumlah akar *N. tabacum* L. pada cekaman Cu, Cd, dan Pb.

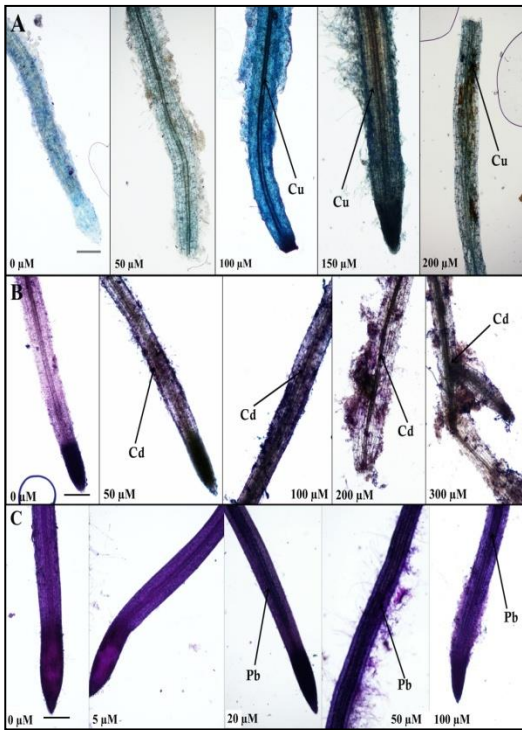
Akumulasi dan Lokalisasi Logam dalam Akar

Hasil uji AAS menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi logam maka semakin besar akumulasi logam ditemukan dalam akar kecuali pada cekaman Cd. Akumulasi Cd pada konsentrasi 200 μM lebih besar dibanding dengan konsentrasi 300 μM (Tabel 1). Pada cekaman Cu, akumulasi Cu positif ditemukan pada konsentrasi 100 μM , 150 μM , dan 200 μM , sedangkan pada cekaman Pb, akumulasi hanya terdapat pada konsentrasi terbesar yaitu 100 μM .

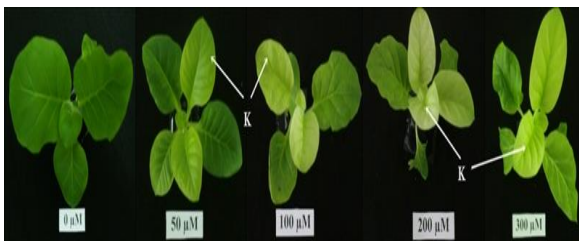
Lokalisasi deposit logam berat umumnya terlihat pada jaringan pembuluh pada silinder pusat (Gambar 2). Pada cekaman Cd konsentrasi 200 μM dan 300 μM terlihat kerusakan jaringan akar cukup signifikan.

Tabel 1. Kandungan logam dalam akar tembakau pada cekaman Cu, Cd, dan Pb

| Konsentrasi Cu (μM) | Kadar Cu ($\mu\text{g/g}$) |
|----------------------------------|------------------------------|
| 0 | Tidak terdeteksi |
| 50 | Tidak terdeteksi |
| 100 | 0.206209 |
| 150 | 0.344913 |
| 200 | 3.453577 |
| Konsentrasi Cd (μM) | Kadar Cd ($\mu\text{g/g}$) |
| 0 | Tidak terdeteksi |
| 50 | Tidak terdeteksi |
| 100 | 0.72164 |
| 200 | 18.860594 |
| 300 | 8.310196 |
| Konsentrasi Pb (μM) | Kadar Pb ($\mu\text{g/g}$) |
| 0 | Tidak terdeteksi |
| 5 | Tidak terdeteksi |
| 20 | Tidak terdeteksi |
| 50 | Tidak terdeteksi |
| 100 | 0.02392 |



Gambar 2. Perbandingan anatomi akar tembakau antar cekaman logam A). Akar tembakau pada cekaman Cu 0-200 μM dengan pewarna *methyl blue* (perbesaran 4x10). B). Akar tembakau pada cekaman Cd 0-300 μM dengan pewarna *hematoxylin* (4x10) dan C). Akar tembakau pada cekaman Pb 0-100 μM dengan pewarna *Crystal violet* (4x10). Bar: 100 μm



Gambar 3. Hasil pengamatan kualitatif. A. Perbandingan warna daun *N. tabacum* L. pada cekaman Cd konsentrasi 0-300 μM dan identifikasi klorosis (panah, K). B. Perbandingan warna daun *N. tabacum* L. pada cekaman Pb konsentrasi 0 μM dan 100 μM.

Efek terhadap Warna Daun

Pada penelitian ini cekaman Cu tidak menyebabkan gejala klorosis pada daun, namun cekaman Cd dan Pb menunjukkan gejala klorosis ditemukan pada sampel yang terpapar logam pada konsentrasi tinggi yakni Cd pada 50-300 μM (Gambar 3A) dan 100 μM Pb (Gambar 3B).

PEMBAHASAN

Efek Cekaman Logam terhadap Pertumbuhan Akar

Penggunaan kultur cair terbukti efektif digunakan dalam uji toleransi atau uji tantang logam karena memudahkan penyerapan logam. Metode ini telah banyak digunakan pada penelitian lain (Tistama *et al.* 2012; Lequex *et al.* 2010).

Secara umum cekaman logam berat menyebabkan kerusakan intra selular dan ekstra selular yang mengakibatkan gangguan pertumbuhan. Gangguan pertumbuhan yang ditunjukkan oleh parameter pertambahan panjang akar dan jumlah akar disebabkan oleh gangguan

penyerapan mineral penting dan gangguan metabolisme dalam sel (Taiz & Zeiger 2010).

R Penyerapan mineral penting terganggu karena **B**kehadiran Cu yang berlebihan memicu perebutan protein pengikat mineral lain yang dibutuhkan tanaman, sehingga penyerapannya menurun. Selain itu, Cu menurunkan permeabilitas plasmalema dan rusaknya dinding sel (Fry *et al.* 2002). Hal tersebut menurunkan daya filter sel terhadap penyerapan Cu, sehingga Cu mudah diserap sel. Di dalam sel, akumulasi Cu menyebabkan penurunan kadar mineral penting seperti Ca, K, P dan Mn sehingga memicu terjadinya gangguan pembelahan sel (Lequex *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2001). Mineral-mineral tersebut berperan dalam aktivitas enzimatik dan pembentukan energi dalam sel, berkurangnya ATP akibat menurunnya Ca mengganggu dan memperlambat pembelahan.

Terbentuknya akar baru tidak dipengaruhi oleh Cu, hal ini dikarenakan rendahnya respon terbentuknya akar dibanding dengan respon elongasi akar terhadap cekaman Cu (Arduini *et al.* 1995; Mahmood *et al.* 2007). Cekaman logam berat mempengaruhi sintesis hormon dalam tumbuhan seperti etilen, sitokinin dan auxin yang mempengaruhi terbentuknya sel baru. Namun belum diketahui bagaimana respon hormonal pada penelitian ini.

Logam Cd dan Pb tidak memiliki fungsi biologis sehingga tidak memiliki transporter spesifik di dalam sel. Logam Cd menyebabkan beberapa abnormalitas seperti patahnya kromosom, terbentuknya jembatan anaphase dan lainnya (Zou *et al.* 2012). Secara *in vitro* kehadiran Cd mempengaruhi keseimbangan hara mikro dan

makro, sehingga cekaman Cd menyebabkan gangguan metabolisme yang menyebabkan menurunkan pertumbuhan akar. Beberapa transporter seperti *ATP-metal binding*, *Natural Resistance Associated Macrophase* (NRAMP) dan *Zinc Transporter* (ZIP) tidak hanya mampu mengikat mineral esensial seperti Fe dan Zn tapi juga logam Cd. Pada saat cekaman, konsentrasi Cd yang melimpah menyebabkan selektivitas transporter menurun sehingga Cd memblokir pengikatan Fe dan Zn.

Pb berperan dalam penurunan pertumbuhan akar dan tunas yang disebabkan oleh penurunan pembelahan sel, fotosintesis, dan sintesis protein (Sharma & Dubey 2005) dan pemblokiran mineral penting seperti Ca^{2+} . Hal ini akibat menurunnya selektivitas protein pengikat Ca. Tidak terpengaruhnya penambahan jumlah akar terkait erat dengan adanya kemungkinan mekanisme pertahanan antara lain: produksi hormon pengatur tumbuh yang memiliki efek yang berlawanan dengan cekaman logam seperti etilen (Manara 2012). Etilen merangsang pembentukan auxin yang mampu membantu pertumbuhan akar. Selain itu secara alami tembakau mampu memproduksi peptida kelator logam seperti fitokelatin dan methalothionein (Krystofova *et al.* 2012).

Akumulasi dan Lokalisasi Logam dalam Akar

Pada penelitian ini uji AAS pada semua cekaman logam menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi logam maka semakin besar akumulasi logam ditemukan dalam akar kecuali pada akumulasi Cd. Pada konsentrasi 200 μ M Cd, akar mengakumulasi logam lebih besar dibanding dengan konsentrasi 300 μ M Cd. Penyerapan

logam dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti konsentrasi, muatan ion dan ada tidaknya transporter dalam sel (Manara 2012; Szöllösi *et al.* 2011). Logam Cu yang merupakan mikronutrien yang dibutuhkan tumbuhan memiliki transporter khusus sehingga mudah diserap oleh tanaman. Penyerapan dilakukan secara simplas dan apoplas, sehingga banyak ditemukan akumulasi Cu pada jaringan pengangkut dan silinder tengah. Gejala keracunan Cu yang umumnya terjadi adalah lignifikasi (Arduini *et al.* 1995; Lequex *et al.* 2010). Polimerasi lignin dikatalisis oleh enzim peroksidase dan lakase yang merupakan glikoprotein yang mengandung Cu (Quiroga *et al.* 2000).

Translokasi Cd dilakukan melalui xylem sehingga akumulasi banyak ditemukan pada jaringan pengangkut (Liu *et al.* 2010; Ratheesh *et al.* 2010). Kehadiran Cd dalam akar menyebabkan degradasi sel yang mengakibatkan rusaknya sel (Gambar 2B). Rusaknya sel diakibatkan cekaman Cd yang mengganggu metabolisme sel penyerapan hara esensial (Kurtyka *et al.* 2008). Kandungan Cd pada konsentrasi 200 μM lebih besar dibanding 300 μM menunjukkan bahwa konsentrasi bukanlah faktor absolut penyerapan logam. Taiz & Zeiger (2010) menyebutkan bahwa konsentrasi ion, potensi kimia, potensi elektrik dan tekanan hidrostatik merupakan faktor pengangkutan dan

KESIMPULAN

Secara umum hasil penelitian ini dapat disimpulkan ke dalam tiga poin: 1) Konsentrasi logam berat Cu, Cd, dan Pb dalam media cair setengah MS berpengaruh signifikan terhadap pertambahan panjang akar, namun tidak

translokasi ion. Pb ditranspor dalam akar secara simplas dan apoplas, sehingga banyak ditemukan pada jaringan pengangkut (Ghelich *et al.* 2013) dan ditemukan dalam sel tumbuhan (Kopittke *et al.* 2007; Ghelich *et al.* 2013). Kehadiran Pb terbukti menghambat pertambahan panjang akar dan jumlah akar tembakau.

Efek Cekaman Logam terhadap Warna Daun

Klorosis disebabkan oleh berkurangnya mineral yang dibutuhkan untuk produksi klorofil seperti Fe, Mg dan N akibat terganggunya metabolisme internal ataupun cekaman eksternal (Wann 1930). Kehadiran Cu tidak menyebabkan klorofil karena peran Cu sebagai mikronutrien dan translokasi Cu dari akar ke batang relatif rendah (Manara 2012). Sedangkan pada cekaman Cd, terjadi perebutan transporter antara Cd dengan mineral pembentuk klorofil seperti Fe dan Zn (Nazar *et al.* 2012; Manara 2012). Pb juga dilaporkan memiliki daya translokasi yang rendah sehingga efek toksik Pb tidak terekspresi pada daun (Piano *et al.* 2008), namun pada konsentrasi yang tinggi Pb mampu menyebabkan gejala klorosis (Gambar 3B). Hal ini dikarenakan kehadiran Pb dapat secara langsung menghambat produksi klorofil dalam kloroplas (Sharma & Dubey 2005).

berpengaruh signifikan pada parameter pertambahan jumlah akar logam Cu dan Cd; 2) Terdapat perbedaan tingkat kerusakan anatomi akar, akumulasi logam, dan warna daun pada setiap konsentrasi dan jenis logam dalam media; 3) Berdasarkan analisis kuantitatif, tembakau mampu mentoleransi cekaman logam Cu pada level ≤ 100

μM , Cd pada konsentrasi $< 50 \mu\text{M}$ dan Pb pada konsentrasi $\leq 5 \mu\text{M}$. Sedangkan berdasarkan analisis kualitatif tembakau mampu mentoleransi cekaman pada konsentrasi logam Cu pada level $\leq 50 \mu\text{M}$, Cd pada konsentrasi $< 50 \mu\text{M}$ dan Pb pada konsentrasi $\leq 20 \mu\text{M}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Alaoui-Sossé B, Genet P, Vinit-Dunand F, Toussaint ML, Epron D, Badot PM. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Sci* 166 :1213–1218.
- Alkhatib R, Creamer R, Lartey RT, Ghoshroy S. 2011. Effect of lead (Pb) on the systemic movement of RNA viruses in tobacco (*Nicotiana tabacum* var. Turkish). *Plant Cell Rep* 30:1427–1434
- Anggraito YU, Suharsono, Pardal SJ, Sopandie D. 2012. Transformasi genetik *Nicotiana benthamiana* L dan kedelai dengan gen MaMt₂ penyandi metallothionein Tipe II dari *Melastoma malabathricum* L. *Forum Pascasarjana* 35:179-188.
- Arduini I, Godbold DL, Onnis A. 1995. Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. Seedlings. *Tree Physiol* 15: 411-415.
- Baranowska-Morek A, Wierzbicka M. 2004. Localization of lead in root tip of *Dianthus carthusianorum*. *Acta Biol Cracoviensia Series Botanica* 46: 45–56.
- Cobbet CS. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*, 123: 825–832.
- Ebbs S, Uchil S. 2008. Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern] involves preferential loss of chlorophyll b. *Phytoscienc* 46: 49-55.
- Fry SC, Miller JC, Dumville JC. 2002. A proposed role for copper ions in cell wall loosening. *Plant Soil* 247: 57–67.
- Ghelich S 1, Zarinkamar, Fatemeh. 2013. Histological and ultrastructure changes in *Medicago sativa* in response to lead stress. *Phyto J2*: 20-29
- Gori P, Schiff S, Santandrea G, Bennici A. 1998. Response of *in vitro* cultures of *Nicotiana tabacum* L. to copper stress and selection of plants from Cu-tolerant callus. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 53: 161–169.
- Hidayati N. 2005. Fitoremediasi dan potensi tumbuhan hiperakumulator [ulasan]. *Hayati* 12: 35-40.
- Jiang W, Liu D, Liu X. 2001. Effects of copper on root growth, cell division and nucleolus of *Zea mays*. *Biol Plant* 44:105-109.
- Kopittke P, Asher CJ, Kopittke RA, Menzies NW. 2007. Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Envir Poll* 150: 280-287.
- Krystofova O, Zitka O, Krizkova S, Hynek D, Shestivska V, Adam V, Hubalek V, Mackova M, Macek T, Zehnalek J. 2012. Accumulation of cadmium by transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) carrying yeast metallothionein gene revealed by electrochemistry. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7: 886-907
- Kumar G, Tripathi R. 2008. Lead-induced cytotoxicity and mutagenicity in grass pea. *Turk J Biol* 32: 73-78.
- Kurtyka R, Małkowski E, Kita A, Karcz W. 2008. Effect of calcium and cadmium on growth and accumulation of cadmium, calcium, potassium and sodium in maize seedlings. *Polish of Environ Study* 17:51-56.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N. 2010. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol Biochem* 48: 673-682.
- Liu X P, Peng K J, Wang A G, Lian C L, Shen Z G. 2010. Cadmium accumulation and distribution in populations of *Phytolacca americana* L. and the role of transpiration. *Chemosphere*, 78:1136–1141.
- Luo Y, Wei Q, Huang M, Xu Y, Chen F. 2006. Isolation of a genomic DNA for *Jatropha curcas* ribosome inactivating protein and its tobacco transformation. *J Shanghai Univ* 10(5): 461-464.
- Mahmood T, Islam KR, Muhammad S. 2007. Toxic effects of heavy metal on early growth and tolerance of cereal crops. *Pak J Bot* 39: 451-462.
- Maheshwari P, Kovalchuk I. 2011. Combination of ammonium nitrate, cerium chloride and potassium chloride salts improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Nicotiana tabacum*. *Plant Biotech Rep* [terhubung berkala].

- <http://springerlink.com> diakses pada 25 April 2013
- Manara A. 2012. Plants responses in heavy metal toxicity. Di dalam: Furini A, editor. *Plants and heavy metals*. SpringerBriefs in Biometals: 27-53
- Nazar R, Iqbal N, Masood A, Khan MIR, Syeed S, Khan NA. 2012. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *American J Plant Sciences* 3: 1476-1489.
- Poschenrieder C, Gunse B, Barcelo J. 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol* 90: 1365-1371.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barcelo' A, Amaya I, Medina M, Alonso FJ, Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V. 2000. A Tomato Peroxidase Involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127
- Piano LD, Abet M, Sorrentino C, Barbato L, Sicignano M, Cozzolino E, Cuciniello A. 2008. Uptake and distribution of lead in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *J Applied Bot Food Qual* 82:21-25.
- Ratheesh CP, Abdussalam A, Nabeesa S, Puthur JT. 2010. Distribution of bio-accumulated Cd and Cr in two *Vigna* species and the associated histological variations. *J Stress Physiol Biochem* 6: 4-12.
- Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiol* 127: 887-898.
- Sabtanto JS, Suhandi. 2005. Pendataan sebaran unsur merkuri pada wilayah pertambangan gunung pani dan sekitarnya Kabupaten Pohuwato, Provinsi Gorontalo. *Hasil Kegiatan Subdit Konservasi TA*.
- Sharma P, Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz J Plat Physiol* 17:35-52.
- Sriprang R, Murooka Y. 2007. Accumulation and detoxification of metals by plants. Di dalam: Singh SN, Triphati Rd editor. *Environmental Bioremediation Technologies*. Springer : 77-100.
- Szôllôsi R, Kálmán E, Medvegyi A, Petôl A, Varga SI. 2011. Studies on oxidative stress caused by Cu and Zn excess in germinating seeds of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) *Acta Biol Szeg* 55:175-178.
- Taiz L & Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc. Sunderland
- Tistama R, Widyastuti U, Sopandie D, Yokota A, Akashi K, Suharsono. 2012. Physiological and biochemical responses to aluminium stress in the root of a biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Hayati* 19:37-38.
- Wann FB. 1930. Chlorosis Yellowing of Plants: Cause and Control. Utah: *UAES Circulars*
- Yoshihara T, Hodoshima H, Miyano Y, Shoji K, Shimada H, Goto F. 2006. Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. *Plant Cell Rep* 25: 365-373
- Zhang J, Zhang X, Duan Y, Han Y. 2013. Construction of a phosphate transporter gene expression vector and its usage for tobacco transformation. *Russ J Plant Physiol* 60:290-294.
- Zou J, Yue J, Jiang W, Liu D. 2012. Effects of cadmium stress on root tip cells and some physiological indexes in *Allium cepa* var *Agrogarium* L. *Acta Biol Crac* 54:129-141.

