

**DETEKSI CEKAMAN OKSIDATIF AKIBAT TOKSISITAS KROM
PADA *Sonchus oleraceus* L. MELALUI PENENTUAN SPESIES OKSIGEN REAKTIF
SECARA SPEKTROFOTOMETRI DAN HISTOKIMIA**

***DETECTION OF OXIDATIVE STRESS DUE TO CHROMIUM TOXICITY ON
SONCHUS OLERACEUS L. BY SPECTROPHOTOMETRICALLY AND
HISTOCHEMICAL DETERMINATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES***

Sri Kasmiyati¹⁾ dan Sucahyo¹⁾

Diterima 21 Oktober 2014, disetujui 11 November 2014

ABSTRACT

*Increased production of reactive oxygen species or ROS is one of the common responses to a wide range of biotic and abiotic stresses. Increased production of ROS is outstripping endogenous antioxidant defense systems has been referred to as oxidative stress. Heavy metals are known to initiate ROS generation which is implicated as a oxidative stress. Cr is a toxic heavy metal that can generate ROS like H₂O₂ and O₂⁻ which cause oxidative stress. In this study, chromium toxicity was studied to detect the oxidative stress on *Sonchus oleraceus* weed plants by the detection of superoxide anion and H₂O₂. Superoxide anion was detected by staining techniques with nitroblue tetrazolium (NBT) and hydrogen peroxide by Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) staining. Results indicated that the plants were grown in sand media generate the highest (0.89 A/g FW and 3.23 mol/g FW) than in soil media (0.23 A/g FW and 2.11 mol/g FW) superoxide anion (*O₂⁻) and H₂O₂ and soil containing textile sludge (0.18 A/g FW and 2.66 mol/g FW), respectively. At application of 10 mg Cr⁶⁺/L and 250 mg Cr³⁺/L, the production of *O₂⁻ and H₂O₂ in leaves of sonchus plants were significantly increased compared with the control plants. The highest production of H₂O₂ and *O₂⁻ were showed in the leaves of sonchus plants grown in sand media with Cr⁶⁺ application. In this study, either Cr³⁺ or Cr⁶⁺ caused oxidative stress in *Sonchus oleraceus* weed plants. The result also showed that sonchus plants esposed to toxic Cr can suffer from oxidative stress leading to reduction of its fresh and dry plants biomass. NBT and DAB in an appropriate probe and significant value for monitoring the formation of *O₂⁻ and H₂O₂ in plants.*

*Keywords: anion superoksida, ROS, deteksi histokima, cekaman oksidatif, H₂O₂, *Sonchus oleraceus**

PENDAHULUAN

Pencemaran logam berat salah satunya krom di lingkungan akibat pembuangan limbah industri dan penggunaan pupuk serta pestisida sintesis secara berlebihan akan memberikan dampak terhadap munculnya cekaman oksidatif terhadap kehidupan tanaman. Salah satu logam berat yang bersifat toksik terhadap tanaman adalah krom yang dapat

menimbulkan cekaman oksidatif. Adanya cekaman oksidatif pada tanaman dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan, menurunkan produktivitas bahkan dapat menyebabkan kematian. Salah satu faktor yang mempengaruhi toksisitas krom terhadap pertumbuhan tanaman adalah media tanam, karena sifat fisik, kimia dan biologi dari media tanam mempunyai peran penting dalam proses transformasi Cr dari bentuk toksik menjadi

¹⁾Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga
penulis untuk korespondensi, email: kas@staff.uksw.edu

bebas dalam bentuk species oksigen reaktif (ROS) sebagai hasil samping dari metabolisme aerob yang berlangsung di berbagai kompartemen seluler seperti dinding sel (peroksidase dan poliamin oksidase), sitoplasma, peroksisom (xanthin oksidase), mitokondria dan kloroplas (Kumar dkk., 2014; Vianello dkk., 2007; Malecka dkk., 2009). Pembentukan ion-ion radikal bebas seperti ROS akan mengalami peningkatan apabila tanaman mengalami cekaman baik abiotik maupun biotik. Akumulasi ion radikal bebas dalam bentuk ROS pada konsentrasi tinggi akan merusak komponen-komponen seluler dan makromolekul termasuk membran plasma, asam nukleat dan protein. Pembentukan ROS juga mempunyai fungsi sebagai efektor dan regulator dalam proses kematian sel terprogram (Malecka dkk., 2014). Selain itu, pembentukan ROS dalam jumlah sangat besar pada sel/jaringan tumbuhan juga dapat dijadikan sebagai indikator adanya cekaman oksidatif yang dapat mengancam kelangsungan kehidupan tumbuhan.

Logam berat pada umumnya menginduksi pembentukan ROS baik secara langsung maupun melalui reaksi redoks. Krom merupakan logam yang bersifat non-redoks dan tidak terlibat dalam reaksi Fenton, namun dari hasil penelitian Shi dan Dalal (1989) dilaporkan bahwa Cr dapat berperan dalam reaksi Fenton, dibuktikan bahwa Cr memiliki karakter redoks. Berdasarkan hasil penelitiannya Strile, dkk. (2003) juga dilaporkan bahwa Cr^{6+} dan Cr^{5+} secara katalitik bersifat aktif dan memiliki kemampuan untuk membentuk ROS seperti radikal hidroksil (OH^\cdot). Aktivitas katalitik Cr^{3+} lebih tinggi dalam sistem reaksi Fenton dibandingkan dengan logam yang lain seperti Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , dan Fe^{3+} , tetapi lebih rendah dibanding Cu^{2+} . Reaktivitas krom dapat disebabkan oleh interaksinya dengan glutathion, NADH dan H_2O_2 , pembentuk radikal-radikal OH^\cdot di dalam sistem bebas sel (Shi dan Dalal, 1989). Pembentukan H_2O_2 , OH^\cdot dan $^*\text{O}_2$ pada kondisi stress krom telah banyak ditunjukkan pada berbagai jenis tumbuhan, dan memunculkan terjadinya stress

oksidatif yang mengakibatkan kerusakan pada DNA, protein dan pigmen, serta menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid (Panda dan Patra, 2000; Panda, 2003).

Diantara ion-ion radikal bebas yang tergolong dalam ROS, anion superoksida dan H_2O_2 merupakan dua species oksigen reaktif yang penting sebagai indikator adanya kerusakan atau toksisitas di dalam sel, serta sebagai indikator munculnya reaksi pertahanan terhadap berbagai kondisi cekaman lingkungan. Oleh karena itu perlu dikembangkan metode untuk penentuan kadar kedua species oksigen reaktif tersebut. Beberapa metode yang telah diterapkan adalah menggunakan probe spin superoksida-spesifik seperti assay dengan chemiluminescence, fluorescence dan spektrofotometer (Shulaev dan Oliver, 2006). Pengembangan metode deteksi secara langsung ROS secara *in vivo* dengan metode histokimia dapat dilakukan menggunakan *ROS tracer dye* yaitu *nitroblue tetrazolium* (NBT) untuk $^*\text{O}_2$ dan 3,3 *Diaminobenzidine* (DAB) untuk H_2O_2 . NBT dan DAB berfungsi sebagai substrat *chromogenic*, dan hasil reaksi warna yang terbentuk dapat diamati menggunakan mikroskop. Penelitian bertujuan untuk mendeteksi adanya cekaman oksidatif akibat toksisitas krom pada gulma *Sonchus oleraceus* pada media tanam yang berbeda melalui penentuan kadar $^*\text{O}_2$ dan H_2O_2 secara spektrofotometri dan histokimia.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan bahan gulma *Sonchus oleraceus* yang diperoleh dari daerah Getasan, Kabupaten Semarang, adapun penanaman dilakukan menggunakan 3 media pertumbuhan meliputi pasir steril, tanah pertanian, dan tanah mengandung limbah sludge tekstil yang diperoleh dari salah satu industri tekstil di Salatiga dengan perbandingan 1:1 (tanah:sludge tekstil). Pemberian perlakuan krom dalam dua bentuk spesies Cr^{6+} dalam bentuk senyawa $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dan Cr^{3+} dalam bentuk senyawa

CrCl_3 dengan konsentrasi 0 mg Cr/L (sebagai kontrol), 5 mg Cr/L untuk Cr^{6+} , serta 250 mg Cr/L untuk Cr^{3+} . Perlakuan Cr diberikan sebanyak 250 ml dengan konsentrasi sesuai perlakuan pada media tanam sebanyak 750 mg. Perlakuan Cr dilarutkan dalam pupuk cair lengkap dan disiramkan pada media tanam, serta dibiarkan selama 2 hari sebelum ditanami *Sonchus oleraceus*. Setelah 2 hari, gulma *Sonchus oleraceus* umur 3 minggu ditanam pada masing-masing media kontrol dan perlakuan Cr. Penanaman dilakukan sampai gulma *S. oleraceus* berumur \pm 3 bulan. Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAK (rancangan acak kelompok) faktorial dengan 2 faktor perlakuan Cr dan jenis media tanam. Setiap perlakuan dengan 10 ulangan, setiap unit percobaan terdiri dari 1 gulma *sonchus*.

Pengamatan pertumbuhan tanaman berdasarkan pada penentuan biomassa basah dan kering. Akumulasi Cr di dalam tanaman ditentukan melalui pengukuran kandungan Cr^{6+} dan Cr total. Kandungan Cr^{6+} dalam tanaman ditentukan secara spektrofotometris menggunakan metode difenilkarbasid melalui pembacaan nilai serapan pada panjang gelombang 540 nm (Sharma dkk., 2011), sedangkan Cr total ditentukan dengan AAS (spektrofotometer serapan atom dengan pembacaan nilai serapan pada panjang gelombang 357,87 nm). Cekaman oksidatif akibat perlakuan Cr pada tanaman *S. oleraceus* ditentukan melalui pengukuran level H_2O_2 dan H_2O_2 yang terbentuk secara spektrofotometris menggunakan sampel pucuk. Penentuan level H_2O_2 di dalam sel menurut metode Sergiev (1997) yang digunakan Bouazizi dkk. (2007), sedangkan H_2O_2 dengan metode Kumar dkk. (2014) dan Malecka dkk. (2014). Deteksi H_2O_2 yang terbentuk pada daun dilakukan secara histokimia menggunakan NBT sebagai substrat kromogenik dan hasil reaksi warna yang terbentuk setelah diinkubasi selama 1 jam diamati menggunakan mikroskop. Data level anion superoksida dan H_2O_2 dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dan dilanjutkan

dengan uji Duncan pada taraf uji 5 persen. Uji korelasi Pearson dilakukan untuk mengetahui korelasi antar variabel, sedangkan data histokimia dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Biomassa tanaman

Biomassa massa tanaman diukur berdasarkan berat basah dan berat keringnya. Pengukuran berat basah tanaman lebih mudah dilakukan, dapat menunjukkan aktivitas metabolisme, namun nilainya tidak konstan sebab dipengaruhi kandungan air dalam sel.

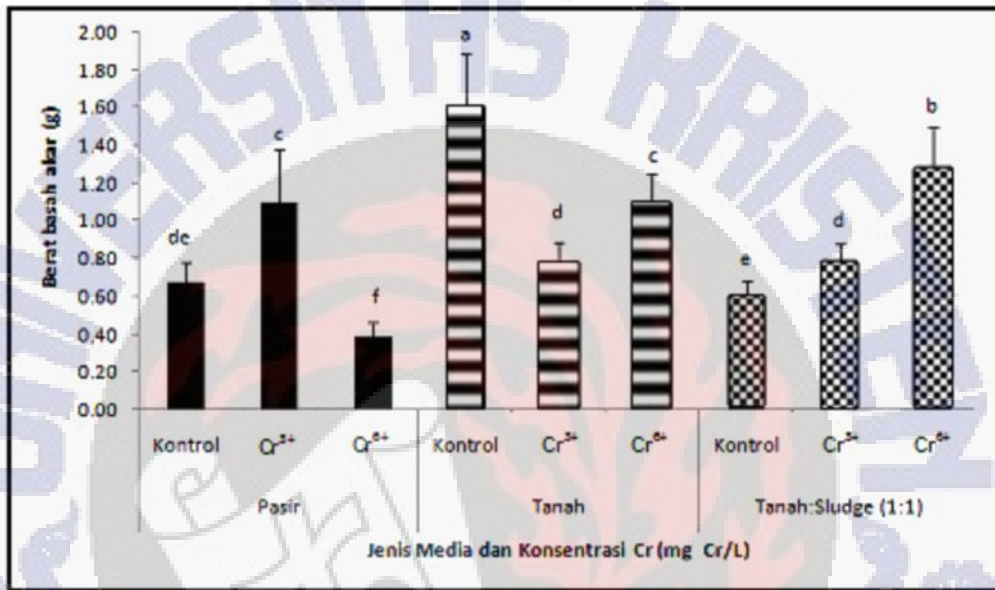
Pengukuran pertumbuhan yang lebih akurat adalah dengan mengukur berat kering dengan cara dikeringkan pada suhu 80°C selama 3 hari di dalam oven sehingga air yang terkandung dalam tanaman menguap. Setelah kering didinginkan dan ditimbang berulang sampai diperoleh berat konstan. Jika dibandingkan antara berat kering mula-mula dengan berat kering pada selang beberapa waktu maka dapat diketahui ada atau tidaknya pertumbuhan. Hasil berat kering merupakan keseimbangan antara fotosintesis dan respirasi.

Perlakuan Cr pada media tanam yang berbeda memberikan pengaruh secara nyata terhadap biomassa basah dan kering pada akar dan pucuk gulma *Sonchus* (Gambar 1 dan 2). Biomassa basah akar dan pucuk tanaman yang ditumbuhkan pada media pasir mengalami penurunan paling besar pada perlakuan Cr^{6+} . Pada media tanah dan campuran tanah:sludge tekstil (1:1) tanaman *sonchus* menunjukkan biomassa basah akar dan pucuk lebih tinggi dibandingkan yang ditumbuhkan pada media pasir, meskipun sama-sama diberi perlakuan Cr dalam medianya. Bahkan pada media campuran tanah:sludge tekstil yang telah terdeteksi mengandung polutan Cr^{6+} pun masih menunjukkan biomassa akar dan pucuk lebih tinggi dibandingkan pada pasir. Hal ini menunjukkan bahwa pada media pasir, toksisitas Cr lebih tinggi dibandingkan dalam media tanah dan campuran tanah:sludge

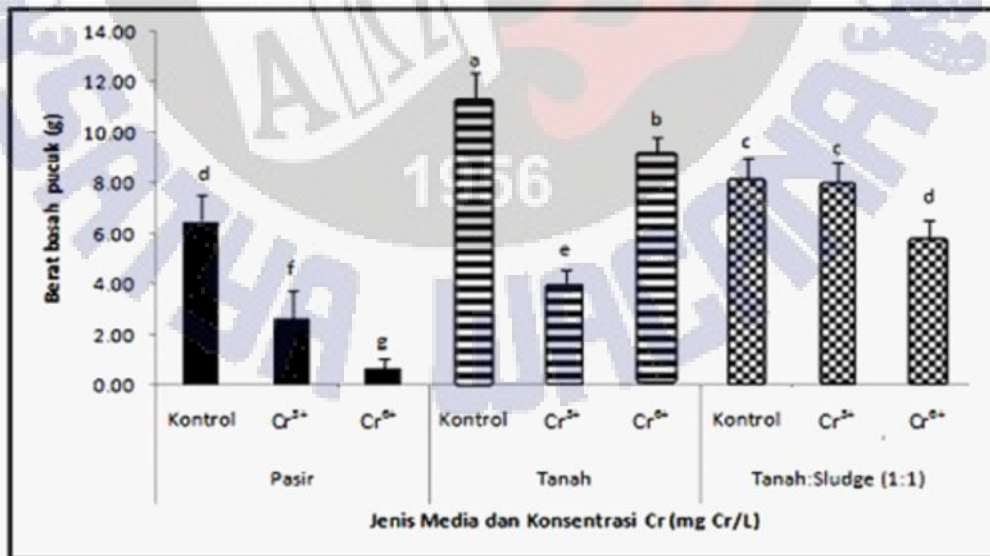
tekstil. Kandungan dan komposisi nutrisi tanah dan sludge tekstil lebih punya kemampuan menopang pertumbuhan tanaman sonchus dengan adanya perlakuan Cr. Jumlah nutrisi dan keberadaan mikroorganisme yang bermanfaat bagi tanaman dalam media tanah, sludge tekstil, maupun campuran tanah:sludge tekstil mempunyai peran besar dalam menekan toksisitas Cr terhadap gulma *S. oleraceus*. Dibandingkan dengan pasir yang relatif bersifat inert (tidak mengandung nutrisi),

tanah dan sludge tekstil banyak mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman. Kandungan unsur hara esensial seperti N, P, K, S, Bo, Cu, Zn dan lain-lain banyak ditemukan pada media tanah dan sludge. Sludge tekstil selain mengandung beberapa jenis logam berat yang tergolong B₃, dilaporkan mengandung unsur-unsur yang dibutuhkan oleh tanaman diantaranya nitrogen, fosfor, kalium, dan sulfur dalam jumlah yang sangat besar (Herawati dkk., 2008).

A.



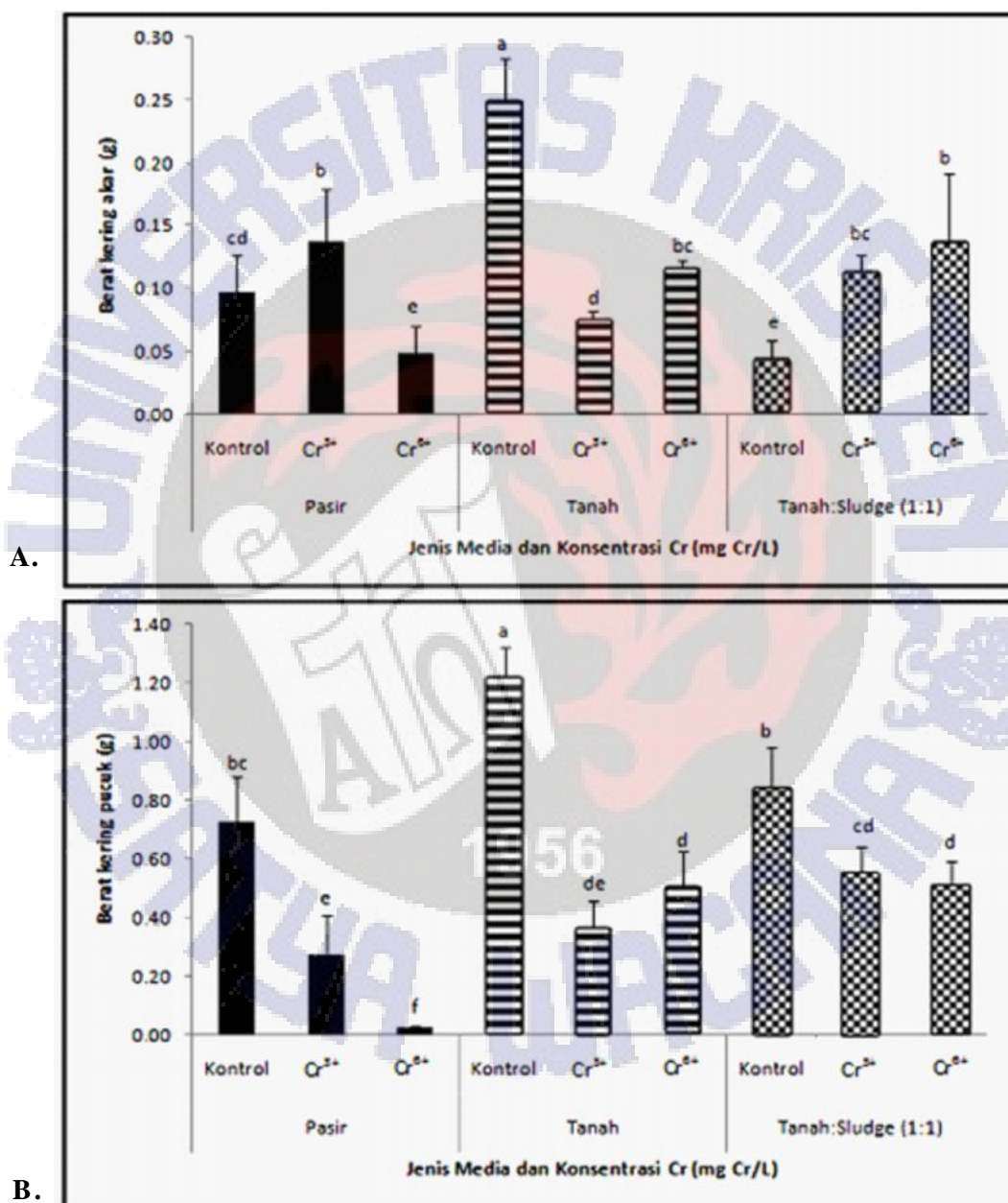
B.



Gambar 1. Efek interaksi antara jenis media tanam dan perlakuan Cr terhadap biomassa basah akar (A) dan pucuk (B) tanaman *S. oleraceus*

Media tanam dan Cr menunjukkan efek interaksi terhadap biomassa kering akar dan pucuk gulma sonchu. Gambar 2 menunjukkan pengaruh nyata kedua perlakuan tersebut terhadap biomassa kering tanaman. Pengaruh Cr terhadap biomassa kering akar dan pucuk menunjukkan pola yang hampir sama dengan biomassa basah, dimana tanaman sonchus yang ditumbuhkan pada media

pasir mengalami penurunan biomassa kering akar dan pucuk paling besar pada perlakuan Cr⁶⁺ dibandingkan pada tanah dan campuran tanah:sludge tekstil. Biomassa kering pucuk pada semua perlakuan Cr mengalami penurunan dibandingkan kontrol, baik pada media pasir, tanah maupun campuran tanah:sludge tekstil.



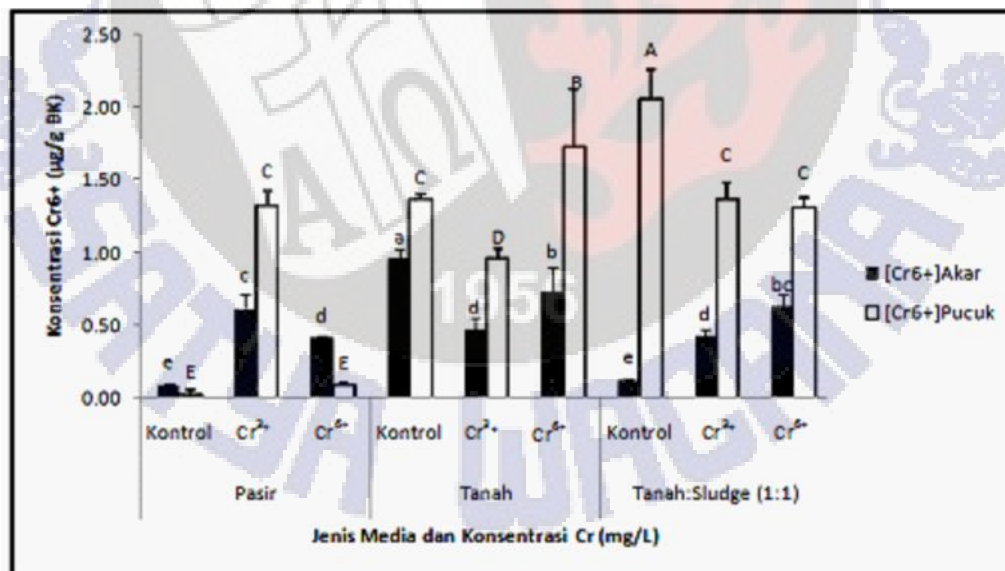
Gambar 2. Efek interaksi antara jenis media tanam dan perlakuan Cr terhadap biomassa kering akar (A) dan pucuk (B) tanaman *S. oleraceus*

Seperti logam berat yang lain, krom yang terakumulasi di dalam jaringan tumbuhan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan aktivitas fisiologis. Menurut Srivastava dan Gupta (1996) toksisitas krom umumnya menghambat pertumbuhan memanjang akar dan tunas, serta menginduksi terjadinya klorosis pada daun. Sun dan Wu (1998) melaporkan bahwa *Ipomoea aquatica* Forsk. cv. Bamboo-Leaf mengalami klorosis pada perlakuan Cr^{6+} sebesar 1,25 ppm. Pada konsentrasi lebih dari 1,25 ppm (5 dan 10 ppm), tanaman mengalami penghambatan pertumbuhan, akar mengalami nekrosis, daun layu dan jumlah tunas berkurang. Toksisitas krom terhadap tanaman sangat ditentukan oleh bentuk species kimia dari unsur tersebut. Krom dalam bentuk Cr^{6+} bersifat lebih toksik terhadap tanaman dibandingkan bentuk Cr^{3+} . Menurut Gundersen dkk. (1982) fitotoksitas Cr^{6+} lebih besar dibanding Cr^{3+} dan penyerapan (*uptake*) Cr dari tanah meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi Cr dalam tanah. Tanaka dkk. (1980) menyatakan bahwa pada konsentrasi tertentu Cr^{6+} lebih membahaya-

kan dibanding Cr^{3+} . Srivastava dkk. (1999) melaporkan bahwa pada dosis sebesar 150-300 mg/ml, Cr^{6+} lebih toksik terhadap *Allium cepa* dibanding Cr^{3+} . Efek toksik krom terhadap tumbuhan tidak lepas dari akumulasi logam berat ini di dalam jaringan.

Kandungan Cr^{6+} dan Cr total

Akumulasi Cr^{6+} dan Cr total di dalam jaringan tanaman sonchus diukur untuk mengetahui seberapa besar kemampuannya menyerap, mentoleransi dan mentranslokasi Cr yang diserap ke bagian tanaman. Akumulasi Cr^{6+} di dalam jaringan/organ tanaman dapat juga menjadi indikator kemampuan suatu tanaman untuk mendetoksifikasi logam Cr, karena apabila tanaman terdeteksi mengakumulasi Cr^{6+} dalam tubuhnya dan tidak mengalami gangguan pertumbuhan, hal ini menunjukkan bahwa tanaman memiliki kemampuan untuk medetoksifikasi atau mentoleransi logam Cr^{6+} tersebut.

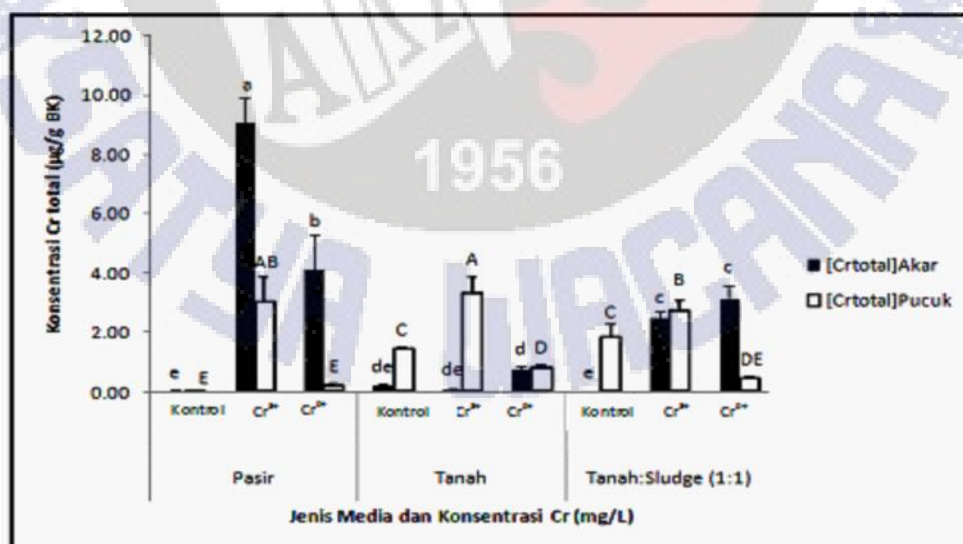


Gambar 3. Efek interaksi antara jenis media tanam dan perlakuan Cr terhadap konsentrasi Cr^{6+} dalam akar dan daun *S. oleraceus*

Gambar 3 menunjukkan bahwa perlakuan Cr dan media tanam pada *S. oleraceus* memberikan pengaruh nyata terhadap akumulasi Cr⁶⁺ pada akar dan pucuk. Akumulasi Cr⁶⁺ lebih banyak terdeteksi di bagian pucuk dibanding di dalam akar, terutama pada *S. oleraceus* yang ditumbuhkan dalam media tanah dan campuran tanah:sludge tekstil. *Sonchus* yang ditumbuhkan pada media pasir menunjukkan akumulasi Cr⁶⁺ lebih kecil dibandingkan yang ditumbuhkan pada media tanah dan campuran tanah:sludge tekstil terutama yang diberi perlakuan Cr⁶⁺. Rendahnya akumulasi Cr⁶⁺ pada pucuk *S. oleraceus* yang ditanam pada media pasir mengandung Cr⁶⁺ disebabkan oleh ketidakmampuan akar untuk mentoleransi toksisitas Cr⁶⁺, hal ini ditunjukkan dengan paling rendahnya biomassa basah dan kering dari akar dan lebih lanjut berdampak pada biomassa pucuk. Selain itu, dengan aktifnya sistem antioksidan pada tanaman *sonchus* yang ditanam pada media pasir untuk merespon cekaman toksisitas Cr⁶⁺ juga dapat menghambat terjadinya translokasi Cr⁶⁺ ke bagian pucuk. Hal ini ditunjukkan daun *sonchus* yang ditumbuhkan pada media pasir, cenderung lebih tinggi dibanding pada media tanah dan campuran tanah:sludge tekstil.

Berbeda dengan pola akumulasi Cr⁶⁺, akumulasi Cr total dalam akar tanaman paling tinggi ditunjukkan pada tanaman yang ditumbuhkan pada media pasir yang diberi perlakuan Cr³⁺ dan Cr⁶⁺ (Gambar 4). Hasil ini juga mendukung rendahnya akumulasi Cr⁶⁺ di bagian pucuk dari tanaman *sonchus* yang ditanam pada media pasir.

Terdeteksinya Cr⁶⁺ dalam akar dan pucuk tanaman *sonchus* yang ditumbuhkan pada media pasir, menunjukkan bahwa meskipun Cr³⁺ dianggap kurang toksik dibanding Cr⁶⁺, namun di dalam media dapat mengalami transformasi menjadi Cr⁶⁺ yang bersifat toksik. Reaksi oksidasi Cr di dalam tanah dan perairan alami tergantung pada keberadaan senyawa oksidan. Senyawa oksidan utama yang terdapat di dalam tanah yang dapat mengoksidasi Cr³⁺ menjadi Cr⁶⁺ adalah Mn oksida. Oksidasi Cr³⁺ menjadi Cr⁶⁺ mempunyai dampak yang tidak menguntungkan bagi lingkungan. Proses oksidasi akan mengubah krom dari bentuk tidak larut, tidak toksik dan tidak berbahaya (Cr³⁺) menjadi bentuk krom yang terlarut, toksik dan berbahaya (Cr⁶⁺). James dan Bartlett (1983) melaporkan bahwa peningkatan penyerapan krom oleh tanaman kacang kapri yang diberi perlakuan Cr⁶⁺, disebabkan adanya



Gambar 4. Efek interaksi antara jenis media tanam dan perlakuan Cr terhadap konsentrasi Cr total dalam akar dan daun *S. oleraceus*

peningkatan kelarutan Cr(OH)₃ oleh sitrat dalam tanah yang meningkatkan laju oksidasi Cr³⁺ menjadi Cr⁶⁺ oleh oksida mangan dalam tanah.

Deteksi dan penentuan radikal bebas

Spesies oksigen reaktif (ROS) umumnya dihasilkan oleh sel melalui lintasan metabolisme aerobik dan merupakan respon terhadap berbagai cekaman abiotik maupun biotik. Berbagai spesies oksigen reaktif yang terbentuk sebagai salah satu terhadap adanya cekaman abiotik dan biotik antara lain *O₂, H₂O₂, OH, *OH, dan oksigen singlet (¹O₂). Pembentukan ROS di dalam sel tumbuhan mempunyai dua fungsi utama yaitu (1) sebagai signal intrinsik untuk proses-proses pertumbuhan dan perkembangan dan (2) sebagai molekul signal untuk merespon adanya kondisi cekaman. *O₂ dan H₂O₂ merupakan spesies oksigen reaktif yang dapat dijadikan sebagai indikator adanya kerusakan sel atau toksisitas serta munculnya reaksi pertahanan terhadap berbagai kondisi cekaman pada tumbuhan.

Pada penelitian ini ditentukan dua spesies oksigen reaktif yaitu *O₂ dan hidrogen H₂O₂ untuk mendeteksi terjadinya toksisitas dan munculnya reaksi pertahanan terhadap cekaman perlakuan Cr pada tanaman *S. oleraceus*. Salah satu

pengaruh cekaman logam berat terhadap tumbuhan adalah menyebabkan terjadinya cekaman oksidatif, dan logam berat Cr merupakan salah satu logam yang bersifat redoks aktif dan dapat memacu munculnya cekaman oksidatif pada sel tumbuhan. Berdasarkan hasil penentuan level H₂O₂ dan *O₂ ditunjukkan bahwa jenis media tanam dan perlakuan Cr (Cr⁶⁺ 10 ppm dan Cr³⁺ 250 ppm) mempengaruhi level kedua spesies oksigen reaktif tersebut (Tabel 1). Tanaman *S. oleraceus* yang ditumbuhkan pada media pasir memproduksi *O₂ dan H₂O₂ lebih tinggi berturut-turut (0.89 A₅₈₀/g BB dan 3.23 μmol/g BB) dibandingkan pada media tanah (0.23 A₅₈₀/g BB dan 2.11 μmol/g BB) dan tanah mengandung sludge tekstil (0.18 A₅₈₀/g BB dan 2.66 μmol/g BB).

Penambahan Cr⁶⁺ sebesar 10 mg Cr⁶⁺/L dan Cr³⁺ sebesar 250 mg Cr³⁺/L meningkatkan secara nyata pembentukan *O₂ dan H₂O₂ dalam daun *S. oleraceus* dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan Cr). Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan Cr dalam media tanam memberikan kondisi cekaman terhadap pertumbuhan *S. oleraceus* sehingga spesies oksigen reaktif (*O₂ dan H₂O₂) dibentuk sebagai signal untuk memunculkan reaksi pertahanan antioksidatif. Pengaktifan sistem pertahanan antioksidatif dilakukan melalui pembentukan

Tabel 1. Level *O₂ dan H₂O₂ daun *S. oleraceus* pada perlakuan Cr dan media tanam

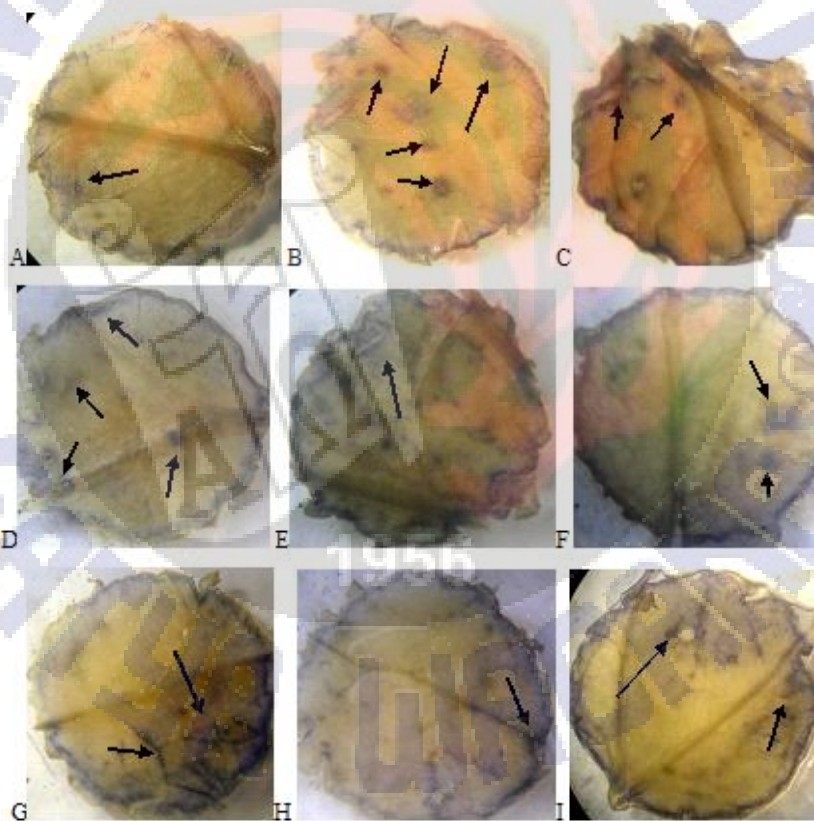
| Level anion superoksida (*O₂) (A₅₈₀/g BB) | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Perlakuan | Pasir | Tanah | Tanah:Sludge(1:1) | Rata-rata |
| Kontrol | 0.18 ± 0.018 cd | 0.21 ± 0.028 c | 0.09 ± 0.010 d | 0.16 ± 0.038 C |
| CrCl ₃ 250 mg Cr ³⁺ /L | 0.53 ± 0.061 b | 0.25 ± 0.023 c | 0.21 ± 0.028 c | 0.33 ± 0.100 B |
| K ₂ Cr ₂ O ₇ 10 mg Cr ⁶⁺ /L | 1.96 ± 0.059 a | 0.22 ± 0.026 cd | 0.25 ± 0.023 c | 0.81 ± 0.575 A |
| Rata-rata | 0.89 ± 0.542 A | 0.23 ± 0.013 B | 0.18 ± 0.048 B | |
| Level H₂O₂ (μmol/g BB) | | | | |
| Perlakuan | Pasir | Tanah | Tanah:Sludge(1:1) | Rata-rata |
| CrCl ₃ 250 mg Cr ³⁺ /L | 1.80 ± 0.208 e | 2.36 ± 0.092 c | 2.20 ± 0.176 d | 2.12 ± 0.167 C |
| K ₂ Cr ₂ O ₇ 10 mg Cr ⁶⁺ /L | 3.31 ± 0.331 b | 2.07 ± 0.184 c | 2.87 ± 0.089 c | 2.75 ± 0.364 B |
| CrCl ₃ 250 mg Cr ³⁺ /L | 4.58 ± 0.212 a | 1.89 ± 0.239 cd | 2.90 ± 0.161 c | 3.12 ± 0.787 A |
| Rata-rata | 3.23 ± 0.804 A | 2.11 ± 0.139 C | 2.66 ± 0.277 B | |

kandungan antioksidan dan pengaktifan enzim antioksidatif dalam daun.

Pengaruh interaksi antar perlakuan terhadap level $*O_2$ dan H_2O_2 daun terlihat nyata hanya pada penambahan Cr^{6+} sebesar 10 mg Cr^{6+}/L baik pada media pasir, tanah maupun tanah mengandung sludge tekstil. Deteksi keberadaan $*O_2$ dilakukan dengan reaksi histokimia menggunakan senyawa NBT (*nitrotetrazolium blue chloride*) sebagai substrat kromogenik. Teknik ini dapat diterapkan secara langsung untuk mendeteksi pembentukan $*O_2$ dalam jaringan, sel maupun subseluler secara *in vivo* dan dideteksi secara mikroskopis. NBT akan bereaksi dengan $*O_2$ endogen membentuk senyawa formazan tak

larut yang berwarna biru keunguan. Hasil deteksi histokimia $*O_2$ dalam jaringan daun *S. oleraceus* pada perlakuan Cr dan media tanam ditunjukkan pada Gambar 5.

Berdasarkan hasil deteksi histokimia $*O_2$ dalam daun *S. oleraceus* menggunakan NBT, ditunjukkan bahwa daun dari tanaman yang ditumbuhkan pada media pasir dan campuran tanah:sludge tekstil (1:1) yang diberi perlakuan Cr (Cr^{3+} maupun Cr^{6+}) memberikan reaksi positif yang lebih tinggi dibandingkan pada tanah. Reaksi positif ditunjukkan oleh terbentuknya bercak-bercak biru-ungu (senyawa formazan tidak larut) sebagai akibat reaksi NBT dengan $*O_2$. Lingkaran biru yang terdapat tepi irisan daun sebelah



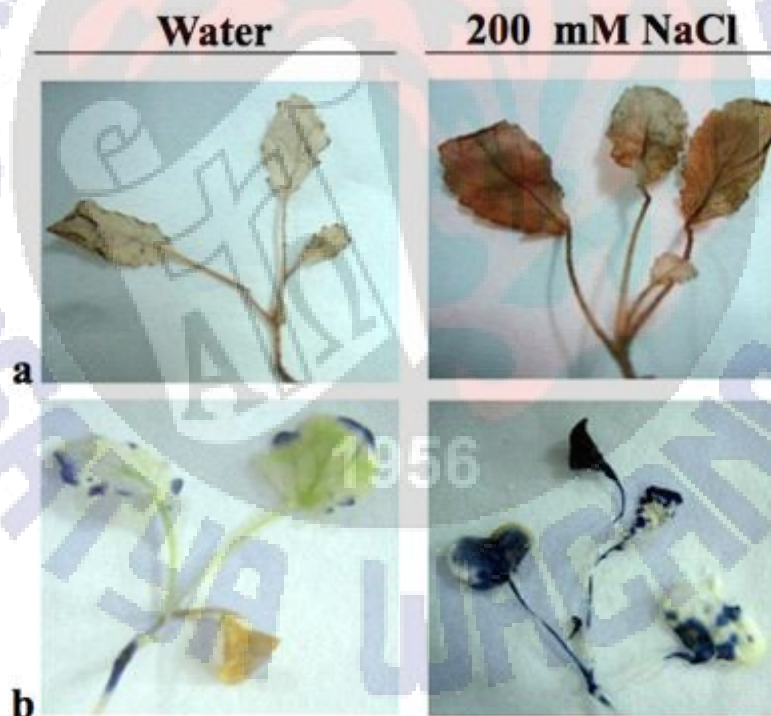
Gambar 5. Deteksi histokimia lokasi pembentukan $*O_2$ pada jaringan daun *S. oleraceus* yang ditanam pada media pasir (A. kontrol, B. Cr^{3+} 250 mg Cr^{3+}/L , dan C. Cr^{6+} 10 mg Cr^{6+}/L), tanah:sludge tekstil (1:1) (D. kontrol, E. Cr^{3+} 250 mg Cr^{3+}/L , dan F. Cr^{6+} 10 mg Cr^{6+}/L) dan tanah (G. kontrol, H. Cr^{3+} 250 mg Cr^{3+}/L , dan I. Cr^{6+} 10 mg Cr^{6+}/L). Tanda panah menunjukkan daerah reaksi positif dengan NBT (terjadi pembentukan $*O_2$)

luar baik pada kontrol dan perlakuan Cr untuk ketiga jenis media tanam menunjukkan terbentuknya *O_2 sebagai respon terhadap pelukaan saat pengirisan daun. Bercak biru gelap pada daun *S. oleraceus* belum terlihat jelas, diduga NBT yang digunakan kurang konsentrasinya atau kurang lama meredamnya sehingga reaksi oksidasi NBT oleh *O_2 belum sering terjadi. Menurut Lin dkk. (2009) NBT dalam merupakan probe yang sesuai dan bernilai penting untuk memonitoring pembentukan O_2^- pada tumbuhan.

Selain *O_2 , deteksi H_2O_2 dalam jaringan/organ juga dapat dilakukan dengan menggunakan pewarna DAB sebagai *probe dye*-nya. Menurut Kumar dkk. (2014) DAB akan dioksidasi oleh H_2O_2 oleh adanya enzim peroksidase dan akan menghasilkan warna coklat kemerahan (Gambar 6).

Di dalam penelitian ini deteksi H_2O_2 hanya dilakukan melalui pengukuran secara spektrofotometris jumlah H_2O_2 yang terbentuk di dalam daun. H_2O_2 dan *O_2 merupakan dua spesies oksigen reaktif yang dapat digunakan sebagai indikator adanya kerusakan atau toksisitas di dalam sel, serta sebagai indikator munculnya reaksi pertahanan terhadap berbagai kondisi cekaman lingkungan. Deteksi histokimia akumulasi H_2O_2 dan *O_2 menggunakan *probe dye* DAB dan NBT pada jaringan tumbuhan sangat berpotensi dikembangkan untuk memonitoring terjadinya cekaman oksidatif pada tumbuhan baik yang diakibatkan oleh adanya cekaman abiotik maupun biotik.

Metode deteksi histokimia ini dapat diterapkan pada semua jenis tumbuhan mulai pada tingkat



Gambar 6. Deteksi akumulasi H_2O_2 (a) dan *O_2 (b) pada kecambah *Brassica juncea* yang diberi perlakuan cekaman salinitas 200 mM NaCl selama 3 hari. Kecambah yang ditumbuhkan dalam media air digunakan sebagai kontrol (Kumar dkk., 2014)

sel, jaringan maupun organ. Deteksi pembentukan $*O_2$ menggunakan NBT assay telah dilakukan pada sel tunggal tembakau yang mengalami respon hipersensitif (Adam dkk. 1989), pada daun *Arabidopsis* yang diberi cekaman cahaya (Fryer dkk. 2002), pada daun tembakau yang diberi cekaman ozon (Schraudner dkk., 1998), dan pada daun *Pisum sativum* yang diberi cekaman salinitas (Hernandez dkk. 2001). Malecka dkk. (2014) melaporkan juga penggunaan NBT assay untuk mendeteksi pembentukan $*O_2$ pada akar *Pisum sativum* yang diberi perlakuan kombinasi cekaman 2 logam berat (Cu, Zn, Cd dan Pb). Lin dkk. (2009) melaporkan penggunaan deteksi histokimia (NBT assay) untuk pengukuran $*O_2$ secara lokalisasi *in situ* pada daun *Alocasia macrorrhiza* yang diberi perlakuan berbagai faktor stress antara lain fotooksidan (methyl viologen dan riboflavin), polutan (sodium bisulfit, logam berat Pb dan Cd), serta kekeringan (PEG 6000).

Korelasi antara Akumulasi Cr dengan Pertumbuhan dan Terbentuknya Radikal Bebas

Analisis korelasi dilakukan untuk mengetahui signifikansi hubungan antara parameter akumulasi logam berat Cr dalam media dan jaringan tanaman sonchus dengan pertumbuhan dan pembentukan radikal bebas (H_2O_2 dan $*O_2$) di bagian daun tanaman. Berdasarkan hasil analisis korelasi Pearson's pada Tabel 2 ditunjukkan bahwa kandungan Cr^{6+} dan Cr total dalam akar dan daun menunjukkan korelasi dengan pertumbuhan dan pembentukan radikal bebas (H_2O_2 dan $*O_2$).

Akumulasi Cr^{6+} dan Cr total di dalam akar berkorelasi positif dengan terbentuknya radikal bebas H_2O_2 , sebaliknya akumulasi Cr (Cr^{6+} dan total) di dalam pucuk berkorelasi negatif dengan radikal bebas H_2O_2 . Pembentukan $*O_2$ berkorelasi negatif dengan akumulasi Cr^{6+} baik di

Tabel 2. Korelasi (Pearson's) antara akumulasi Cr dengan pertumbuhan dan terbentuknya radikal bebas pada gulma sonchus

| | H2O2 | *O ₂ | Cr6A | Cr6P | CrTA | CrTP | BBA | BBP | BKA | BKP |
|-----------------------|---------|-----------------|--------|--------|---------|-------|--------|--------|--------|-------|
| H2O2 | 1,000 | | | | | | | | | |
| *O₂ | 0,779** | 1,000 | | | | | | | | |
| Cr6A | 0,069 | -0,038 | 1,000 | | | | | | | |
| Cr6P | -0,301* | - | 0,302* | 1,000 | | | | | | |
| CrTA | 0,598** | 0,402** | 0,175 | -0,057 | 1,000 | | | | | |
| CrTP | -0,130 | -0,280 | 0,084 | 0,393* | 0,210 | 1,000 | | | | |
| BBA | -0,269 | - | 0,791* | 0,373* | 0,046 | 0,048 | 1,000 | | | |
| BBP | - | - | 0,271 | 0,541* | - | - | 0,529* | 1,000 | | |
| BKA | -0,122 | -0,276 | 0,633* | 0,151 | 0,018 | 0,002 | 0,714* | 0,416* | 1,000 | |
| BKP | - | - | 0,164 | 0,369* | - | - | 0,521* | 0,868* | 0,501* | 1,000 |
| | 0,566** | 0,650** | | | 0,572** | 0,059 | * | * | * | 0 |

Keterangan: H2O2 (konsentrasi H_2O_2), $*O_2$ (level anion superoksida), Cr6A (konsentrasi Cr^{6+} pada akar), Cr6P (konsentrasi Cr^{6+} pada pucuk), CrTA (konsentrasi Cr total pada akar), CrTP (konsentrasi Cr total pada pucuk), BBA (Berat basah akar), BBP (Berat basah pucuk), BKA (Berat kering akar), BKP (Berat kering pucuk).

** Korelasi signifikan pada tingkat signifikansi 1%

* Korelasi signifikan pada tingkat signifikansi 5%

Listwise N= 45

dalam akar dan pucuk, serta Cr total dalam pucuk. Korelasi positif dijumpai antara akumulasi Cr total di dalam pucuk dengan $*O_2$. Adanya korelasi baik positif maupun negatif antara akumulasi Cr^{6+} dan Cr total di dalam akar dan pucuk gulma *sonchus* menunjukkan bahwa Cr dalam organ tanaman punya efek besar dalam memunculkan terjadinya stress oksidatif pada tanaman. Stress oksidatif akibat terbentuknya radikal bebas ini, selanjutnya berdampak negatif terhadap pertumbuhan tanaman, semakin tinggi radikal bebas terbentuk akan semakin menurunkan biomassa tanaman. Hal ini didukung oleh hasil analisis korelasi Pearson yang menunjukkan bahwa ada korelasi negatif antara pembentukan radikal bebas baik dalam bentuk $*O_2$ maupun H_2O_2 dengan biomassa basah dan kering tanaman.

Akumulasi Cr^{6+} dalam akar dan pucuk berkorelasi positif terhadap berat basah dan berat kering tanaman (akar dan pucuk), hal ini menunjukkan bahwa semakin besar akumulasi Cr^{6+} di dalam akar dan daun, biomassa basah dan kering akar serta pucuk semakin meningkat pula. Peningkatan biomassa diduga sebagai salah satu strategi untuk dapat bertahan hidup dan mentoleransi toksisitas Cr. Akumulasi Cr total dalam akar dan pucuk berkorelasi positif dengan biomassa basah dan kering akar, namun berkorelasi negatif dengan biomassa basah dan kering bagian pucuk. Banyaknya akumulasi Cr total di dalam akar dan pucuk akan meningkatkan biomassa baik kering maupun basah bagian akar tanaman, hal ini bertujuan agar tanaman mampu bertahan hidup. Korelasi negatif secara nyata hanya ditunjukkan antara akumulasi Cr total akar dengan berat basah dan kering pucuk. Hasil ini menunjukkan bahwa penurunan pertumbuhan bagian pucuk gulma *Sonchus* secara nyata ditentukan oleh toksisitas Cr dalam akar. Akumulasi Cr di dalam akar akan mempengaruhi pertumbuhan tanaman secara keseluruhan apabila tidak ada proses detoksifikasi. Menurut Cobbett (2000) dan Liu & Kottke (2003) pada umumnya sel-sel tanaman merespon stress logam berat menggunakan berbagai mekanisme

pertahanan, di antaranya eksklusi, immobilisasi, khelasi, dan kompartementalisasi ion logam. Tanaman memiliki kemampuan untuk mencegah ion logam masuk secara berlebihan ke dalam sitosol dan mampu melokalisasi ion logam tersebut pada daerah tertentu. Kompartementasi ion di dalam vakuola merupakan mekanisme yang berperan penting dalam proses detoksifikasi dan toleransi terhadap ion logam. Pada gulma *Sonchus* diduga mekanisme detoksifikasi Cr melalui khelasi oleh senyawa antioksidan seperti glutathion atau senyawa thiol serta dengan kompartementasi di dalam akar dan daun.

KESIMPULAN

Akumulasi Cr baik dalam bentuk Cr trivalen maupun heksavalen dapat menyebabkan terjadinya cekaman oksidatif pada tanaman *sonchus* baik yang ditumbuhkan pada media pasir, tanah maupun campuran tanah:sludge tekstil, hal ini ditunjukkan dengan terdeteksinya peningkatan pembentukan H_2O_2 dan $*O_2$ pada daun gulma yang diberi perlakuan Cr. Pembentukan H_2O_2 dan $*O_2$ paling tinggi dijumpai pada daun gulma *S. oleraceus* yang ditumbuhkan pada media pasir dengan perlakuan Cr^{6+} . Akumulasi Cr^{6+} dan Cr total di dalam akar dan pucuk menunjukkan korelasi dengan pembentukan radikal bebas H_2O_2 dan $*O_2$ pada daun gulma *Sonchus*. NBT merupakan *probe* yang dapat digunakan untuk memonitoring pembentukan $*O_2$ pada daun gulma *S. oleraceus*. Stress oksidatif akibat toksisitas Cr mempengaruhi secara nyata biomassa kering dan basah tanaman *Sonchus*. Perbedaan jenis media tanam mempengaruhi cekaman oksidatif yang ditimbulkan oleh Cr pada gulma *Sonchus*, terutama dalam hal pembentukan H_2O_2 dan $*O_2$. Cekaman oksidatif paling tinggi dijumpai pada gulma *Sonchus* yang ditumbuhkan pada media pasir steril.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian dan publikasi hasil penelitian ini terlaksana atas bantuan pendanaan DIKTI melalui program Hibah Bersaing Tahun 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, A., Farkas, T., Somlyai, G., Hevesi, M., and Kiraly, Z. 1989. *Consequence of O₂ generation during bacterial induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34:13-26
- Bouazizi, H., Jouili, H., and Ferjani, E.E. 2007. *Effects of copper excess on growth, H₂O₂ production and peroxidase activities in maize seedling (Zea mays)*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. No.10, Vol. 5:751-756. ISSN 1028-8880
- Cobbett, C. S. 2000. *Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification*. *Plant Physiology* 123: 825–832.
- Fryer, M.J., Oxborough, K., Mullineaux, P.M., and Baker, N.R. 2002. *Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves*. *J. Exp. Bot.* 53:1249-1254
- Gundersen, P., C.B. Gunse and J. Barcelo, 1982. *Phytotoxicological Effects of Chromium in Soil*. *Nordisk Jordbrugsforskning* 64: 4, 481.
- Herawati, M.M, S. Kasmiyati., S., dan E.B.E. Kristiani, 2008. *Pengelolaan Limbah Padat Tekstil dengan metode Pengomposan dan Fitoremediasi*. Laporan Hasil Penelitian Program Penelitian Teknologi Tepat Terpadu, Dinas Pendidikan dan Kebudayaan Provinsi Jawa Tengah (tidak dipublikasikan).
- Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R., and Sevilla, F. 2001. *Antioxidant systems and O₂⁻/H₂O₂ production in apoplast of pea leaves*. *Plant Physiol.* 127:817-831.
- James, B. R. and R. J. Bartlett. 1983. *Behavior of chromium in soils: V. Fate of organically complexed Cr(II) added to soil*. *J. Environ. Qual.* 12:169-172.
- Kumar, D., Yusuf, M.A., Singh, P., Sardar, M. And Sarin, N.B. 2014. *Histochemical detection of superoxide and H₂O₂ accumulation in Brassica juncea seedlings*. <http://www.bio-protocol.org/>. 12 Juli 2014
- Lin, Z.F., Liu, N., Lin, G.Z. and Peng, C.L. 2009. *In situ localisation of superoxide generated in leaves of Alocasia macrorrhiza (L.) Shott under various stresses*. *J. Plant Biol.* 52:340-347. DOI 10.1007/s12374-009-9044-8.
- Liu, D. and Kottke, I. 2003. *Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of Allium cepa by EELS and ESI*. *Cell Biology and Toxicology* 19: 299-311
- Malecka, A., Piechalak, A., Zielinska, B., Kutrowska, A., and Tomaszewska, B. 2014. *Response of the pea roots defense systems to the two-element combinations of metals (Cu, Zn, Cd, Pb)*. *Acta Biochimica Polonica*. No. 1, Vol. 61:23-28. Online at: www.actabp.pl
- _____, Derba-Marceluch, A., Kaczorowska, M., Piechalak, A., and Tomaszewska, B. 2009. *ROS production and antioxidative defense system in pea root cells treated with lead ions*. Part 2. Mitochondrial and peroxisomal level. *Acta Physiol. Plant.* 31:1065-1075
- Panda S.K. and Patra, H.K. 2000. *Does Cr(III) produces oxidative damage in excised wheat leaves*. *J. Plant Biol.* 27(2):105-110
- _____. 2003. *Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in Taxithelium sp*. *Curr. Sci.* 84: 631–633

- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., van Camp, W., Inze, D., Langebartels, C., and Sandermann, H. Jr. 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J.* 16:235-245.
- Shulaev, V. and Oliver D.J. 2006. *Metabolic and proteomic markers for oxidative stress.* New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiol.* 141:367-372.
- Srivastava, P.C. and U.C. Gupta, 1996. *Trace Elements In Crop Production.* Science Publisher Inc. USA. pp. 226-230.
- Srivastava, S., S. Prakash and M.M. Srivastava, 1999. *Chromium Mobilization and Plant Availability – The Impact of Organic Complexing Ligands.* *Plant and Soil* 212: 203-208.
- Sun, E. and Wu, F. 1998. *Along-vein Necrosis as Indicator Symptom on Water Spinach Caused by Nickel in Water Culture.* *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39:255-259.
- Tanaka, A., T. Tadano and O. Hayakawa, 1980. *Comparison of Adaptability to Heavy Metals among Crop Plants (V) Adaptability to Chromium-Studies on Comparative Plant Nutrition.* *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* 51:2, 113-118.
- Vianello, A., Zancani, M., Peresson, C., Petrusa, E., Casolo, V., Krajnakova, J., Patui, S., Braidot, E., and Marci, F. 2007. *Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death.* *Physiol. Plant* 129:242-252.
