

## **Ca<sup>2+</sup> INTRASELULER TERLIBAT DALAM MEKANISME PEMBUKAAN STOMATA AKIBAT PENGARUH AUXIN**

MADE PHARMAWATI, MADE RIA DEFIANI, NI LUH ARPIWI  
*Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana,  
Kampus Bukit Jimbaran. Email:  
pharmawati@hotmail.com*

### **INTISARI**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan Ca<sup>2+</sup> intraseluler dalam mekanisme gerakan stomata yang disebabkan oleh auxin. Auxin dalam bentuk LAA dan NAA menyebabkan peningkatan pembukaan stomata. Penambahan EGTA, Ruthenium red dan Procaine yang merupakan modulator Ca<sup>2+</sup> menghambat induksi pembukaan stomata oleh hormon tumbuhan. EGTA dan Procaine menghambat pembukaan stomata yang diinduksi oleh LAA dan NAA pada konsentrasi 100 uM dan 1 mM. Ruthenium red memberikan pengaruh pada konsentrasi yang lebih rendah yaitu 10 uM, 50 uM dan 100 uM pada induksi pembukaan stomata oleh LAA, sedangkan pada induksi pembukaan stomata oleh NAA, Ruthenium red berpengaruh pada konsentrasi 10 uM, 50 uM, 100 uM dan 1 mM). Hal ini menunjukkan bahwa dalam kerjanya, IAA dan NAA tergantung pada Ca<sup>2+</sup>

*Kata kunci: kalsium, auxin, stomata*

### **ABSTRACT**

1

Research was done to elucidate the role of Ca<sup>2+</sup> intracellular in stomatal movement induced by auxin. Two types of auxin (IAA and NAA) increased stomatal opening and the increase was concentration dependent. The addition of EGTA, Ruthenium red and Procaine as the modulator of Ca<sup>2+</sup> concentration, inhibited stomatal opening induced by auxin. EGTA and procaine significantly inhibited stomatal opening at 100 uM and 1 mM. Ruthenium red worked at lower concentrations which were 10 uM, 50 uM and 100 uM on LAA-induced stomatal opening, while on NAA-induced stomatal opening, Ruthenium red had an effect at 10 uM, 50 uM, 100 uM and 1 mM. It is suggested that Ca<sup>2+</sup> involves in stomatal opening induced by LAA and NAA as signaling agent.

*Keywords: calcium, auxin, stomata*

### **PENDAHULUAN**

Stomata merupakan bagian pada epidermis organ tumbuhan yang terdiri dari suatu celah yang dikelilingi oleh sel khusus yang disebut sel penjaga. Stomata sangat penting bagi tumbuhan karena pori stomata merupakan tempat terjadinya pertukaran gas dan air antara atmosfer dengan system ruang antar sel yang berada pada jaringan mesofil di bawah epidermis. Hal ini menyebabkan stomata sangat berperan dalam proses transpirasi dan fotosintesis (Moore *et al.*, 1998).

Pergerakan pori stomata disebabkan oleh perubahan pada volume sel penjaga yang diatur oleh keluar masuknya ion K<sup>+</sup> dan ion-ion lain dari dan ke sel penjaga selama proses pembukaan dan penutupan stomata. Sehubungan dengan fungsi stomata untuk menjaga hidrasi dan pertukaran gas, maka perubahan volume sel penjaga merupakan respon terhadap factor-

faktor lingkungan dengan melalui sinyal-sinyal yang kompleks (Moore *et al.*, 1998, Hopkins, 1999).

Cahaya, konsentrasi CO<sub>2</sub>, kelembaban dan hormone tumbuhan merupakan beberapa factor yang mempengaruhi membuka dan menutupnya stomata (Kearn dan Assmann, 1993, Hopkins, 1999). Cahaya menyebabkan membukanya stomata sedangkan keadaan gelap, peningkatan konsentrasi CO<sub>2</sub> dan turunnya kelembaban menyebabkan menutupnya stomata. Di antara sekian banyak hormone tumbuhan, ABA (abscisic acid) dan auxin merupakan hormone tumbuhan yang terkenal mempunyai pengaruh pada pergerakan stomata. ABA menyebabkan menutupnya stomata sedangkan auxin menyebabkan membukanya stomata (Hopkins, 1999).

Dalam proses fisiologi seluler terdapat beberapa sinyal yang berfungsi sebagai perantara yang dikenal dengan istilah second messenger yang terjadi setelah terbentuk kompleks hormone-reseptor (Assmann,

1993). Pada hewan, keberadaan second messenger dan aturan utamanya dalam sel telah banyak diketahui. Pada tumbuhan proses biokimia yang mengikuti kompleks hormone-reseptor belum banyak diteliti. Walaupun dilaporkan bahwa pH intraseluler (Gehring *et al*, 1997), siklus nukleotida (Pharmawati *et al*, 1999), tetapi belum jelas apakah semua hormone tumbuhan menggunakan  $Ca^{2+}$ , pH intraseluler dan siklus nukleotida sebagai perantara untuk menghasilkan respon fisiologis. Oleh karena itu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui apakah IAA (indole-3-acetic acid) dan NAA (naphthalen-3-acetic acid) yang merupakan kelompok hormone auxin dalam menginduksi pembukaan stomata pada epidermis bawah daun *Vicia faba* menggunakan  $Ca^{2+}$  sebagai bagian dari rangkaian sinyal kompleks. Serta untuk menguji apakah  $Ca^{2+}$  dikeluarkan dari tempat penyimpanan seluler (vakuola dan retikulum endoplasma) sebagai respon terhadap auxin.

**MATERI DAN METODE**

**Bahan tanaman**

Biji *Vicia faba* varietas *early long pod* direndam dalam air selama 12 jam dan dikecambahkan pada kertas sating basah dalam cawan petri. Setelah kecambah tumbuh, selanjutnya kecambah ditanam dalam pot dengan media tumbuh tanah dan disiram 1 kali sehari.

**Bioassay untuk respon stomata terhadap auxin**

Lapisan epidermis bawah daun *Vicia faba* yang berumur 4 minggu dikupas dengan menggunakan forcep. Daun diambil pada menjelang pagi hari untuk mengurangi adanya stomata yang sudah terbuka akibat pengaruh cahaya. Lapisan epidermis bawah dipotong dengan ukuran 0.5 cm x 0.5 cm dan diletakkan pada medium inkubasi (10 mM MES (pH 6.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) dengan lapisan epidermis atas berada pada bagian atas. Auxin yang digunakan adalah IAA dan NAA dengan konsentrasi akhir 1 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM dan 1 mM ditambahkan ke dalam medium inkubasi. Inkubasi dilakukan selama 60 menit dalam keadaan terang.

**Pemberian pengkelat dan penghambat saluran  $Ca^{2+}$**

Ke dalam medium inkubasi ditambahkan EGTA (ethyleneglycol-bis (3-aminoethyl ether)-N,N,N',N' tetraacetate) dengan konsentrasi 1 uM, 10 uM, 100 uM dan 1 mM. Ruthenium red dan procaine ditambahkan secara terpisah dengan konsentrasi akhir 10 uM, 50 uM, 100 uM dan 1 mM.

**Pengukuran pori stomata**

Untuk tiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan, dan tiap ulangan terdiri dari 3 potongan epidermis bawah daun *Vicia faba*. Pengamatan pengukuran stomata dilakukan secara *blind test* (tidak diketahui sampel mana

yang mendapat perlakuan tertentu untuk menghindari bias dalam pengukuran). Setelah selesai tahap inkubasi, potongan epidermis diletakkan pada gelas benda dan diamati dibawah mikroskop. Diameter pori stomata diukur dengan menggunakan micrometer yang sudah dikalibrasi. Pada masing-masing ulangan 30 stomata diukur dari tiap potongan epidermis dari 3 lokasi bidang pengamatan yang berbeda. Data dianalisis dengan menghitung standar error (SE) dan membandingkan antar perlakuan (<http://www.ncsu.edu/labwrite/res/gt/gt-stat-home.html>)

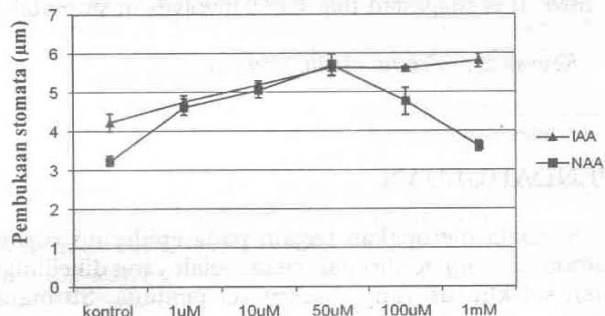
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil**

**Pembukaan stomata oleh IAA dan NAA**

Pada Gambar 1 terlihat bahwa auxin mempengaruhi gerakan stomata. Konsentrasi LAA 1 uM menyebabkan membesarnya pembukaan stomata, tetapi tidak berbeda dengan kontrol. Pemberian IAA sebesar 10 uM menyebabkan peningkatan pembukaan stomata yang berbeda dengan kontrol. Pembukaan stomata terus meningkat sampai pemberian IAA 1 mM tetapi tidak berbeda dengan pemberian konsentrasi 50 uM, 100 uM dan 100 uM.

Pada perlakuan NAA, pemberian NAA dengan konsentrasi 50 uM menghasilkan pembukaan stomata yang maksimum (Gambar 1). Pada pemberian NAA 1 mM, pembukaan stomata mendekati tingkat yang sama dengan kontrol.

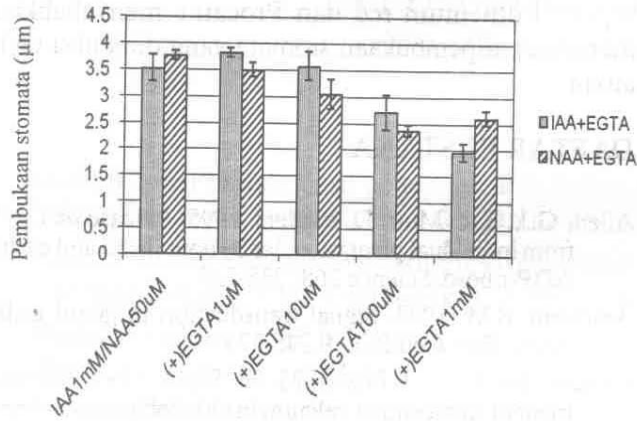


Gambar 1. Pembukaan stomata yang diinduksi oleh IAA dan NAA. Setiap data point merupakan rata-rata ±SE dihitung dari 3 percobaan terpisah.

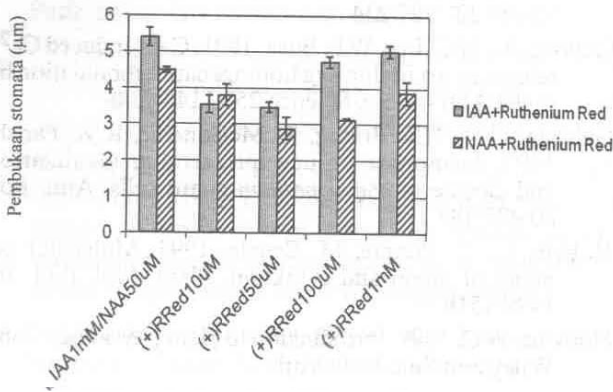
**Pengaruh pengkelat dan penghambat saluran  $Ca^{2+}$**

Respon pembukaan stomata yang diinduksi oleh IAA dan NAA terhadap EGTA sebagai  $Ca^{2+}$  kelator dapat dilihat pada Gambar 2. Pembukaan stomata yang diinduksi oleh IAA mengecil secara signifikan pada konsentrasi EGTA 100 uM. Konsentrasi EGTA 1 mM memberikan penghambatan terbesar. Pada pembukaan stomata yang diinduksi oleh NAA, EGTA menghambat pembukaan stomata pada konsentrasi 100 uM dan 1mM.

Gambar 3 menunjukkan pengaruh Ruthenium red



Gambar 2. Pengaruh EGTA terhadap kemampuan IAA dan NAA untuk membuka stomata. Setiap data point merupakan rata-rata ±SE dihitung dari 3 percobaan terpisah.



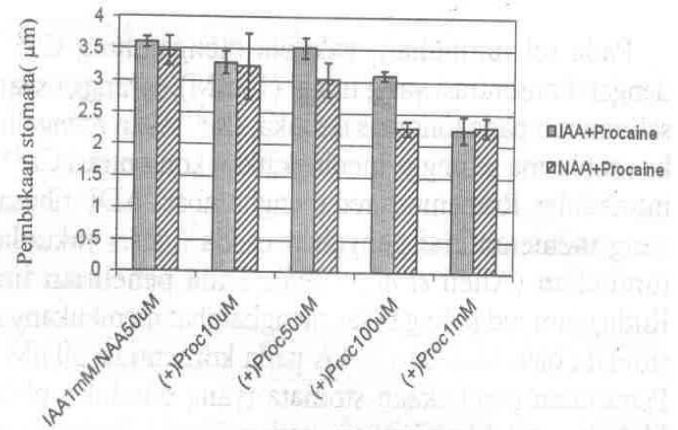
Gambar 3. Pengaruh Ruthenium red terhadap pembukaan stomata yang diinduksi oleh IAA dan NAA. Setiap data point merupakan rata-rata ±SE dihitung dari 3 percobaan terpisah.

terhadap induksi pembukaan stomata oleh IAA dan NAA. Ruthenium red pada konsentrasi 10 µM dan 50 µM menghambat pembukaan stomata yang diakibatkan oleh IAA, sedangkan pada pembukaan stomata yang diinduksi oleh NAA, Ruthenium red mengecilkan pembukaan stomata pada konsentrasi 10 µM, 50 µM, 100 µM dan 1 mM.

Pengaruh pemberian Procaine dapat dilihat pada Gambar 4. Pada induksi pembukaan stomata oleh IAA, pemberian Procaine pada konsentrasi 100 µM dan 1 mM menyebabkan mengecilnya pembukaan stomata. Pada induksi pembukaan stomata oleh NAA, konsentrasi Procaine 100 µM dan 1 mM menyebabkan mengecilnya pembukaan stomata.

## Pembahasan

Hormon tumbuhan berperan sebagai pengatur kesetimbangan air melalui pengaruhnya terhadap gerakan stomata. Dari penelitian ini terlihat bahwa auxin baik IAA maupun auxin sintesis NAA, menginduksi pembukaan stomata, dan pembukaan stomata tersebut tergantung pada konsentrasi yang digunakan. Efek yang dihasilkan oleh auxin berasal dari teraktifikannya bermacam-macam gen dan dari perubahan transport



Gambar 4. Pengaruh Procaine pada pembukaan stomata yang diinduksi oleh IAA dan NAA. Setiap data point merupakan rata-rata ±SE dihitung dari 3 percobaan terpisah.

ion (Hobbie, *et al.*, 1994). Perubahan transport ion terjadi karena perubahan aktivitas plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase atau perubahan aktivitas saluran ion (Claussen, *et al.*, 1997).

IAA sampai konsentrasi 1 mM tetap meningkatkan pembukaan stomata. Respon stomata terhadap konsentrasi IAA terlihat mendekati linier (Gambar 1). Menurut Levitt *et al.*, (1987), IAA pada konsentrasi 10 µM sampai 1 mM menstimulasi pembukaan stomata.

Respon stomata terhadap NAA memiliki puncak pada konsentrasi 50 µM. Konsentrasi NAA di atas 50 µM mengakibatkan berkurangnya pembukaan stomata. Menurut Assmann (1993) auxin bisa mengakibatkan pembukaan atau penutupan stomata. Penutupan stomata oleh auxin berasosiasi dengan pengaturan auxin terhadap tipe R saluran anion (R=rapid). Saluran anion tipe R ini teraktivasi dengan cepat sebagai respon terhadap depolarisasi dan terdeaktivasi dengan cepat sebagai respon terhadap hiperpolarisasi.

Perubahan konsentrasi Ca<sup>2+</sup> dalam sitosol (Ca<sup>2+</sup> intraseluler) telah diketahui berpengaruh dalam banyak jalur signaling, antara lain pada signaling pertumbuhan tabung polen, pertumbuhan ujung akar, respon terhadap stress lingkungan maupun pada penutupan stomata oleh ABA (Absisic acid) (Chalivendra *et al.*, 1994). Konsentrasi Ca<sup>2+</sup> intraseluler juga ditemukan meningkat akibat luka (Saniewski *et al.*, 2006). Pada penelitian ini dibuktikan bahwa perubahan konsentrasi Ca<sup>2+</sup> intraseluler juga berpengaruh pada pembukaan stomata yang diinduksi oleh auxin. Zat-zat yang mengubah konsentrasi Ca<sup>2+</sup> intraseluler yaitu EGTA, Ruthenium red dan Procaine menyebabkan menurunnya pembukaan stomata yang diinduksi oleh auxin.

Gerakan stomata dipengaruhi oleh perubahan konsentrasi Ca<sup>2+</sup> internal. Konsentrasi Ca<sup>2+</sup> intraseluler meningkat mendahului respon stomata terhadap hormone (Irving *et al.*, 1992). Hal ini disebabkan oleh dikeluarkannya Ca<sup>2+</sup> dari tempat penyimpanan seluler. Ruthenium red dan Procaine merupakan zat yang menghambat pengeluaran Ca<sup>2+</sup> dari penyimpanan

intraseluler. Pada sel hewan Ruthenium red dan Procaine menghambat reseptor ryanodine yang berhubungan dengan induksi pengeluaran  $\text{Ca}^{2+}$  (Galione *et al.*, 1991).

Pada sel tumbuhan, vakuola mengandung  $\text{Ca}^{2+}$  dengan konsentrasi yang tinggi (10mM), sehingga saat saluran ion pada tonoplas terbuka,  $\text{Ca}^{2+}$  akan mengalir ke sitoplasma sehingga meningkatkan konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler. Ruthenium red menghambat cADP-ribose yang memerantarai pengeluaran  $\text{Ca}^{2+}$  dari vakuola tumbuhan (Allen *et al.*, 1995). Pada penelitian ini Ruthenium red paling besar menghambat membukanya stomata oleh IAA dan NAA pada konsentrasi 50  $\mu\text{M}$ . Penurunan pembukaan stomata (yang diinduksi oleh IAA dan NAA) akibat pemberian 50  $\mu\text{M}$  Ruthenium red berturut-turut sebesar 1.93  $\mu\text{m}$  dan 1.61  $\mu\text{m}$ . menurut Pineros dan Tester (1997), penghambatan oleh Ruthenium red terjadi pada konsentrasi rendah yaitu 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  sampai 50  $\mu\text{M}$ . tetapi Pineros dan Tester (1997) juga menjelaskan bahwa sensitivitas saluran  $\text{Ca}^{2+}$  pada membrane tumbuhan terhadap zat kimia bervariasi pada tumbuhan yang berbeda.

Procaine bekerja menghambat saluran yang melepaskan  $\text{Ca}^{2+}$  dari retikulum sarkoplasma dengan cara memperpanjang waktu menutupnya saluran ion (Zahradnikova dan Palade, 1993). Dengan tertutupnya saluran ion, maka  $\text{Ca}^{2+}$  tidak dapat dikeluarkan dari retikulum sarkoplasma ke sitoplasma, sehingga konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler menjadi rendah, dan hal ini menghambat pembukaan stomata oleh auxin.

EGTA merupakan zat yang mengkelat  $\text{Ca}^{2+}$ , sehingga menurunkan konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$ . Pada penelitian ini, EGTA pada 100  $\mu\text{M}$  dan 1 mM menyebabkan menurunnya pembukaan stomata akibat induksi IAA dan NAA. Pengaruh EGTA juga dilaporkan oleh Webb *et al.* (1996) yang menemukan bahwa EGTA menurunkan konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler dan menghambat induksi penutupan stomata oleh  $\text{CO}_2$ .

Dari penelitian ini terlihat  $\text{Ca}^{2+}$  terlibat dalam gerakan stomata akibat pemberian hormon. Hal ini dibuktikan dari menurunnya pembukaan stomata oleh hormon jika diberikan zat-zat yang mengkelat  $\text{Ca}^{2+}$  atau zat-zat yang memblok saluran ion. Berarti auxin bekerja membuka stomata melalui mekanisme meningkatnya konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$ . Dengan dihambatnya pengeluaran  $\text{Ca}^{2+}$  dari penyimpanan seluler maka induksi pembukaan stomata oleh auxin menjadi terhambat.

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa auxin mempengaruhi gerakan stomata dengan menginduksi pembukaan stomata. Pengaruhnya ditentukan oleh konsentrasi yang digunakan, dimana IAA membuka stomata *Vicia faba* pada konsentrasi 10  $\mu\text{M}$  sampai 1 mM, sedangkan NAA memberikan respon maksimum pembukaan stomata pada konsentrasi 50  $\mu\text{M}$ .

$\text{Ca}^{2+}$  terlibat dalam mekanisme gerakan membuka stomata yang diinduksi oleh auxin. Pengkelatan  $\text{Ca}^{2+}$  dengan EGTA dan penggunaan inhibitor saluran  $\text{Ca}^{2+}$  seperti Ruthenium red dan Procaine menyebabkan

menurunnya pembukaan stomata yang diinduksi oleh auxin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allen, G.J., S.R. Muir, D. Sanders. 1995. Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from individual plant vacuoles by both InsP3 and cyclic ADP-ribose. *Science* 268: 735-737
- Assmann, S.M. 1993. Signal transduction in guard cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:345-375
- Chalivendra, C. S., J. Zhang, M. M. Sachs. 1994. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. *Plant Physiol.* 105: 369-376
- Claussen, M., H., Luthen, M. Blatt, M. Bottger. 1997. Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* 201:227-234
- Galione, A., H.C. Lee, W.B. Busa. 1991.  $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 253:1143-1146
- Gehring, C.A., H.R. Irving, R. McConchie, R.W. Parish. 1997. Jasmonate induce intraselullar alkalization and closure of *Paphiopedilum* guard cells. *Ann. Bot.* 80:485-489
- Hobbie, L., C. Timpte, M. Estelle. 1994. Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant. Mol. Biol.* 26: 1499-1519
- Hopkins, W.G. 1999. Introduction to plant physiology. John Wiley and Son, New York.
- Irving, H.R., C.A. Gehring, R.W. Parish. 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1790-1794
- Kearns, E.V., S.M. Assmann. 1993. The guard cells environment connection.. *Plant Physiol.* 102:711-715
- Levitt, L.K., D.B. Stein, B. Rubinstein. 1987. Promotion of stomatal opening by indoleacetic acid and ethrel in epidermal strips of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 85: 318-321
- Moore, R., W.D. Clark, D.S. Vodopich. 1998. Botany. McGraw-Hill Companies Inc., USA.
- Pharmawati, M., T. Billington, C.A. Gehring. 1999. Stomatal guard cell responses to kinetin and natriuretic peptides are cGMP-dependent. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:272-276
- Pineros, M., M. Tester. 1997. Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. *J. Exp. Bot.* 48: 551-577
- Saniewski, M., M. Horbowicz, A. Saniewska. 2006. The effect of Ruthenium red, a  $\text{Ca}^{++}$  channel blocker, on a red pigment formation in mechanically wounded scales of *Hippastrum x hybr.* hort., and on the growth and development of *Phoma narcissi*. *J. Fruit Orn. Plant Res.* 14:211-222
- Webb, A.A.R., M.R. McAinsh, T.A. Mansfield, A.M. Hetherington. 1996. Carbondioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium. *Plant J.* 9: 297-304
- Zahradnikova, A., P. Palade. 1993. Procaine effects on single sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *Biophys. J. Biophysical Society* 64:991-1003