

Pengaruh Kadar Air Awal, Kemasan dan Lama Simpan terhadap Protein Membran Dalam Mitokondria Benih Kedelai

The Effect of Moisture Content, Package and Storage Period on Mitochondrial Inner Membrane Protein of Soybean Seed

Aurellia Tatipata^{1*}

Diterima 13 Juli 2007/Disetujui 29 Oktober 2007

ABSTRACT

The research aimed at studying the effect of moisture content, package and storage period on mitochondrial inner membrane protein of soybean seed. The research was conducted in the laboratory of Seed Technology and Microbiology of Gadjah Mada University from May 2002 to August 2003. A Randomized Complete Block Design was used in the experiment with three factors and three replications. The first factor was moisture content consisted of three levels, i.e. 8%, 10%, and 12%. The second was three kinds of packages namely polyethylene plastic, wheat and aluminium foil. The third was the storage period, i.e. 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months. Data collected were analyzed by analysis of variance and Duncan Multiple Range Test. Regression and correlation analysis were done to study the correlation between germination, vigor and protein content of mitochondria inner membrane. Record was made on protein content of mitochondrial inner membrane and its electrophoresis profile, electrical conductivity, germination and vigor. The result showed that moisture content, packaging and storage period had significant influences on protein content of the mitochondria inner membrane and its electrophoresis profile. Inner membrane protein of mitochondrial had a positive correlation with germination and vigor. It was concluded that moisture content, package and storage period affected inner membrane protein content of mitochondria and its protein electrophoresis profile. The protein content of mitochondrial inner membrane, germination and vigor of soybean seed stored in aluminium foil sack at 8%, 10% and 12% moisture content did not decreased within 6 months. Cell membrane damage affected mitochondrial damage.

Key words: Soybean seed, mitochondria inner membrane protein

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L. Merr) merupakan salah satu tanaman palawija yang memiliki kadar protein yang tinggi, yaitu sebesar 37%. Selain protein, benih kedelai juga mengandung lemak cukup tinggi, yaitu sebesar 16%. Kandungan protein dan lemak yang tinggi menyebabkan benih kedelai cepat mengalami kemunduran terutama jika kondisi lingkungan simpan kurang menguntungkan (sub optimum).

Protein yang terkandung di dalam benih kedelai dapat sebagai protein cadangan makanan maupun protein membran yang berfungsi sebagai katalis dan transporter (Sheeler dan Bianci, 1987). Protein membran mitokondria terdiri atas protein ekstrinsik yaitu protein yang terdapat di bagian luar dan melekat pada bagian kepala (*head*) bilayer membran dan protein intrinsik adalah protein yang melekat pada bagian hidrofobik bilayer membran dan berfungsi merentang membran (Alberts *et al.*, 1994). Sebagian besar protein

intrinsik ini adalah enzim respirasi yang terdapat pada membran dalam mitokondria. Lintasan utama transpor elektron terjadi pada membran dalam mitokondria. Proses transfer elektron dan fosforilasi oksidatif menghasilkan ATP, yaitu senyawa berenergi tinggi yang berperan dalam semua jalur biosintesis maupun perkecambahan (Stryer, 1994). Selanjutnya dikatakan bahwa protein membran bersama-sama komponen penyusun membran lainnya, yaitu fosfolipid menjalankan fungsi membran antara lain transpor dan transduksi energi.

Protein membran mitokondria dapat mengalami perubahan atau kerusakan baik kadar maupun profilnya bila temperatur dan kelembaban ruang simpan tinggi (McDonald dan Copeland, 1995). Disamping itu kadar air awal yang tinggi sebelum benih disimpan merupakan faktor utama penyebab kerusakan protein membran mitokondria yang berakibat pada menurunnya fungsi membran sehingga konversi energi terganggu (Heldt, 2003).

¹ Staf pengajar Jurusan Budidaya Pertanian Universitas Pattimura, Jl M Putuhena Poka-Ambon .Telp (0911) 353490 atau lethatatipata@yahoo.com
(* Penulis untuk korespondensi)

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh kadar air benih awal, kemasan dan lama simpan terhadap protein membran dalam mitokondria benih kedelai, serta korelasinya dengan daya berkecambah dan vigor benih kedelai selama penyimpanan. Selain itu, juga menemukan kemasan yang tepat sehingga protein membran dalam mitokondria tidak mengalami kerusakan atau perubahan.

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Kadar air benih awal, kemasan dan lama simpan berpengaruh terhadap protein membran dalam mitokondria.
2. Kadar protein membran dalam mitokondria yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda terhadap viabilitas benih kedelai.
3. Benih kedelai yang disimpan pada kadar air benih awal 8%, 10% dan 12% di dalam kantong aluminium foil dapat mempertahankan kadar protein membran dalam mitokondria, daya berkecambah dan vigor yang tetap tinggi selama 6 bulan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Bioteknologi PAU dan laboratorium Teknologi Benih Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada sejak bulan Mei 2002 sampai dengan Agustus 2003.

Bahan-bahan yang digunakan adalah benih kedelai varietas Willis yang baru dipanen dari Balai Benih Induk Wonosari. Kemasan yang digunakan adalah kantong plastik polietilen, kantong terigu, kantong aluminium foil dan kertas saring untuk mengecambahkan benih. Bahan kimia yang digunakan adalah follin cioacalteu, natrium karbonat, natrium hidroksida, tembaga sulfat, kalium hidrogen fosfat, tris, sodium dodecyl sulfat, metanol, glisin, bromofenol biru, BSA, tris, sukrosa, β -merkaptotanol, natrium klorida, EDTA, magnesium sulfat, buffer French press.

Alat-alat yang digunakan antara lain, sentrifus, spektrofotometer, elektroforesis, sonikator, ultrasentrifus, sentrifus, refrigerator, alat penggerus, germinator, konduktometer.

Cara kerja

- Isolasi mitokondria

Isolasi mitokondria dilakukan menurut metode Day dan Hanson (1977) sebagai berikut:

3 g hipokotil kedelai digerus dalam larutan sukrosa 0.4 M, tris pH 7.6, EDTA 15 M, β -merkaptotanol 5mM. Filtrat disaring, kemudian disentrifus tiga kali berturut-turut dengan kecepatan 600rpm, 800 rpm dan 1000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan debris sel dan kloroplas. Supernatan disentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Pellet yang mengandung mitokondria dicampur dengan larutan sukrosa 0.4 mM, BSA 0.5% (w/v), tris

pH 7.6 50 mM. Suspensi mitokondria disimpan dalam refrigerator. Kadar protein membran dalam mitokondria dianalisis setelah isolasi protein membran berdasarkan metode yang dikemukakan oleh Dickerson *et al.* (1989) sebagai berikut: 40 μ l membran dalam mitokondria dimasukkan ke dalam tabung, kemudian ditambah dengan 6 μ l buffer french press, 4 μ l NaCl 0.15 M, 20 μ l MgSO₄ 2M, 20 μ l β -merkaptotanol 1%, 50 μ l EDTA 15 mM. Campuran divortex, kemudian diinkubasi selama 20 menit. Setelah diinkubasi, campuran disentrifus pada 10000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang mengandung protein membran dalam mitokondria digunakan selanjutnya untuk analisis kadar protein membran dalam dan pengamatan pola pita protein berdasarkan metode Laemmli (1970).

- Protein membran dalam yang sudah diisolasi dari membran mitokondria diukur kadarnya berdasarkan metode Lowry *et al.* (1951) sebagai berikut: 1 ml suspensi protein membran dalam mitokondria dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambah 1 ml larutan Na₂CO₃ 2% (w/v) dalam NaOH 0.1 N, Na⁺K⁺ tartrate 2% (w/v), dan CuSO₄.5H₂O 1% (w/v) dengan perbandingan 10:0.5:0.5. 3 ml Folin-cioacalteu ditambahkan ke dalam kuvet. Setelah diinkubasi selama 10 menit, absorbansi dibaca pada A 600 nm. Untuk kurva standar, digunakan BSA dengan konsentrasi 0; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6, 0.8 dan 1.0 mg ml⁻¹.

- Daya hantar listrik (DHL) benih kedelai diamati dengan merendam 25 butir benih dalam 100 ml aquadestilata selama 20 jam pada suhu kamar. Setelah perendaman, benih diambil dan air rendaman diukur DHLnya dengan konduktometer. Nilai DHL dinyatakan dalam mS (McDonald dan Wilson, 1979).

- Daya berkecambah (ISTA, 1993), dihitung dari jumlah benih yang berkecambah normal dibagi 100 benih dengan 4 ulangan untuk tiap kombinasi perlakuan yang diamati secara kumulatif selama 7 hari dikalikan

$$100\% \text{ DB} = \frac{\text{Jumlah benih berkecambah normal}}{\text{Jumlah benih yang dicecambahkan}} \times 100\%$$

- Pengujian vigor dengan koefisien kecepatan berkecambah (CVG) menurut Kozlowski (1972) adalah

$$100 \times \frac{A_i \text{ (jumlah benih yang berkecambah pada hari ke1 sampai hari ke7)}}{A_i T_i \text{ (waktu yang berkorespondensi dengan } A_i)}$$

Rancangan Percobaan

Penelitian faktorial ini menggunakan RKLK dengan 3 ulangan. Ada 3 faktor, yaitu kadar air awal benih (A), antara lain 8% (A₁), 10% (A₂), 12% (A₃); jenis kemasan (B), antara lain kantong plastik polietilen (B₁), kantong terigu (B₂) dan kantong aluminium foil (B₃) dan lama simpan (C), yaitu tanpa disimpan (C₀), 1 (C₁), 2 (C₂), 3 (C₃), 4 (C₄), 5 (C₅), dan 6 (C₆) bulan. Dengan demikian diperoleh 81 satuan percobaan.

Data hasil pengamatan dianalisis dengan uji ragam ($\alpha = 5\%$) dan uji nilai tengah dengan uji jarak berganda Duncan. Juga dilakukan uji regresi dan korelasi untuk melihat hubungan antara daya berkecambah dan vigor dengan kadar protein membran dalam mitokondria.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

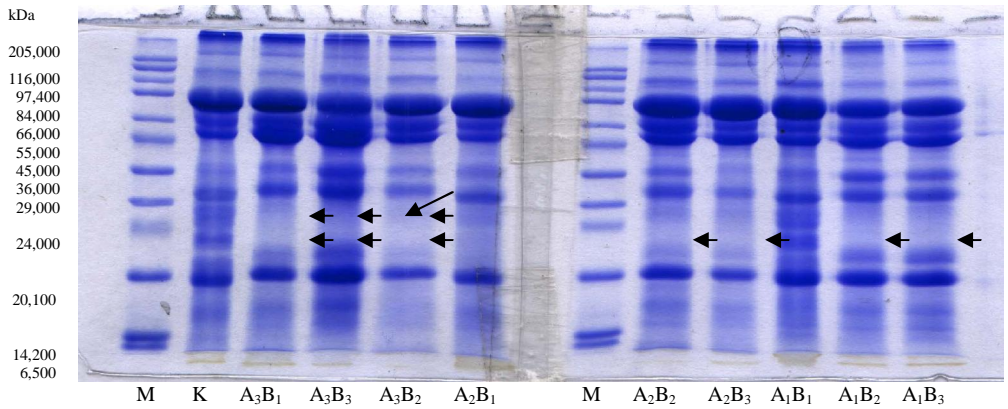
Kadar air awal benih, kemasan dan lama simpan berpengaruh nyata terhadap kadar protein membran

dalam mitokondria (Tabel 1). Kadar protein membran dalam mitokondria benih kedelai yang disimpan pada kadar air awal 8%, 10% dan 12% di dalam kantong terigu menurun secara nyata sejak bulan ke-4, sedangkan yang disimpan di dalam kantong plastik polietilen dan kantong aluminium foil sampai dengan bulan ke-6 belum mengalami penurunan secara nyata. Profil protein secara elektroforesis berubah dibanding kontrol. Perubahan protein ditunjukkan melalui hilang dan berkurangnya penampakan band protein (Gambar 1).

Tabel 1. Pengaruh kadar air awal, kemasan dan lama simpan terhadap kadar protein membran dalam mitokondria (%)

Kadar Air (%)	Lama simpan (bln)	K e m a s a n		
		Plastik P (B)	K. terigu (B)	Al. Foil (B)
8 (A)	C ₀ (0)	1.0846 abc	1.0875 ab	1.1740 a
	C ₁ (1)	0.1767 jklmnop	0.2067 defghijklmno	0.1733 klmnop
	C ₂ (2)	0.9745 abcdefghij	0.8741 bcdefghijk	1.0812 abc
	C ₃ (3)	0.9745 abcdefghij	0.8662 bcdefghijk	1.0040 abcdefghi
	C ₄ (4)	0.8898 bcdefghijk	0.8209 cdefghijk	0.9723 abcdefghij
	C ₅ (5)	0.8790 bcdefghijk	0.8009 efghijk	0.9539 abcdefghijk
	C ₆ (6)	0.8643 bcdefghijk	0.7472 ijk	0.9467 abcdefghijk
10 (A)	C ₀ (0)	1.0753 abcd	1.0703 abcd	1.0650 abcde
	C ₁ (1)	0.9457 abcdefghijk	0.9849 abcdefghi	1.0495 abcdefg
	C ₂ (2)	0.8958 bcdfsghijk	0.9703 abcdefghij	1.0150 abcdefgh
	C ₃ (3)	0.8733 bcefgghijk	0.8741 bcdefghijk	0.9695 abcdefghij
	C ₄ (4)	0.8709 bcdefghijk	0.8009 efghijk	0.9269 abcdefghijk
	C ₅ (5)	0.8708 bcefgghijk	0.7958 fghijk	0.8902 bcefgghijk
	C ₆ (6)	0.8109 defghijk	0.7740 hijk	0.8749 bcdefghijk
12 (A)	C ₀ (0)	1.0662 abcd	1.0641 abcde	1.0573 abcdef
	C ₁ (1)	0.9538 abcdefghijk	0.8359 bcdefghijk	0.9494 abcdefghijk
	C ₂ (2)	0.9302 abcdefghijk	0.9009 bcdefghijk	0.9320 abcdefghijk
	C ₃ (3)	0.9183 abcdefghijk	0.8529 bcdefghijk	0.9141 abcdefghijk
	C ₄ (4)	0.8646 bcdefghijk	0.7913 ghijk	0.8587 bcdefghijk
	C ₅ (5)	0.8406 bcdefghijk	0.7527 hij	0.8297 bcdefghijk
	C ₆ (6)	0.8308 bcdefghijk	0.6912 k	0.8244 bcdefghijk

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT 5%



Gambar 1. Pola pita protein membran mitokondria benih kedelai selama penyimpanan 6 bulan. M = protein standar (marker); K = kontrol

Nilai daya hantar listrik (DHL) benih yang disimpan pada kadar air 8% di dalam kantong plastik, kantong terigu dan kantong aluminium foil meningkat secara nyata masing-masing sejak bulan ke-5, ke-3 dan ke-5. Nilai DHL benih yang disimpan pada kadar air

benih awal 10% di dalam kantong plastik polietilen, kantong terigu dan aluminium foil meningkat sejak bulan ke-4, ke-3 dan ke-5, sedangkan pada kadar air benih 12% di dalam kemasan yang sama, meningkat sejak bulan ke-4, ke-2 dan ke-4 (Tabel 2).

Tabel 2. Pengaruh kadar air awal, kemasan dan lama simpan terhadap daya hantar listrik (mS)

Kadar Air (%)	Lama simpan (bln)	K e m a s a n		
		Plastik P (B)	K. terigu (B)	Al. Foil (B)
8 (A)	C ₀ (0)	0.1500 p	0.1633 mnop	0.1533 op
	C ₁ (1)	0.1767 jklmnop	0.2067 defghijklmno	0.1733 klmnop
	C ₂ (2)	0.1800 ijklmnop	0.2167 bcdefghijklmno	0.1833 hijklmnop
	C ₃ (3)	0.1933 efghijklmnop	0.2313 bcdefghijkl	0.1967 bcdefghijklmn
	C ₄ (4)	0.1967 efghijklmnop	0.2367 abcdefghijk	0.2167 abcdefghijklmno
	C ₅ (5)	0.2333 abcdefghijk	0.2400 abcdefghij	0.2367 abcdefghijk
	C ₆ (6)	0.2367 abcdefghijk	0.2467 abcdefgh	0.2433 abcdefghi
10 (A)	C ₀ (0)	0.1600 nop	0.1600 nop	0.1630 nop
	C ₁ (1)	0.1867 ghijklmnop	0.1633 mnop	0.1800 ijklmnop
	C ₂ (2)	0.1900 fghijklmnop	0.2133 cdefghijklmnop	0.2033 defghijklmnop
	C ₃ (3)	0.2000 efghijklmnop	0.2333 abcdefghijk	0.2167 bcdefghijklmno
	C ₄ (4)	0.2267 abcdefghijkl	0.2367 abcdefghijk	0.2200 bcdefghijklmn
	C ₅ (5)	0.2300 abcdefghijkl	0.2367 abcdefghijk	0.2500 abcdefg
	C ₆ (6)	0.2400 abcdefghij	0.2567 abcde	0.2533 abcdef
12 (A)	C ₀ (0)	0.1667 mnop	0.1600 nop	0.1600 nop
	C ₁ (1)	0.1633 mnop	0.1867 ghijklmnop	0.1733 klmnop
	C ₂ (2)	0.2133 cdefghijklmnop	0.2267 bcdefghijklm	0.2000 efghijklmnop
	C ₃ (3)	0.2300 abcdefghijkl	0.2533 abcdef	0.2133 cdefghijklmnop
	C ₄ (4)	0.2533 abcdef	0.2667 abcd	0.2400 abcdefghij
	C ₅ (5)	0.2667 abcd	0.2733 abc	0.2367 abcdefghijk
	C ₆ (6)	0.2900 a	0.2800 ab	0.2533 abcdef

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT 5%

Daya berkecambah benih kedelai menurun seiring dengan makin tinggi kadar air benih awal dan makin porous kemasan (Tabel 3). Benih yang disimpan pada kadar air benih awal 8% di dalam kantong plastik polietilen, kantong terigu dan kantong aluminium foil

menurun masing-masing sejak bulan ke-5, ke-4 dan ke-6. Pada kadar air benih awal 10%, benih kedelai yang disimpan di dalam kantong plastik polietilen, kantong terigu dan kantong aluminium foil menurun masing-masing sejak bulan ke-4, ke-3 dan ke-4. Benih yang

disimpan pada kadar air benih awal 12% di dalam kemasan yang sama mengalami penurunan daya berkecambah lebih awal, masing-masing sejak bulan ke-1, ke-2 dan ke-4. Hal ini menunjukkan bahwa kadar air awal 12% kurang tepat digunakan untuk menyimpan benih kedelai. Penurunan daya berkecambah diawali oleh penurunan vigor/CVG (Tabel 4). Benih yang disimpan dengan kadar air awal 8%, 10% dan 12%

dalam kantong plastik polietilen mengalami penurunan vigor masing-masing sejak bulan ke-3, ke-3 dan ke-1, sedangkan vigor benih yang disimpan dalam kantong aluminium foil mengalami penurunan sejak bulan ke-5, ke-3 dan ke-3. Penyimpanan benih dengan kadar air awal 8%, 10% dan 12% dalam kantong terigu telah mengalami penurunan vigor sejak bulan ke-2, ke-1 dan ke-1 (Tabel 4).

Tabel 3. Pengaruh kadar air awal, kemasan dan lama simpan terhadap daya berkecambah (%) benih kedelai

Kadar Air (%)	Lama simpan (bln)	K e m a s a n		
		Plastik P (B)	K. terigu (B)	Al. Foil (B)
8 (A)	C ₀ (0)	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	C ₁ (1)	98.00 abcdef	98.00 abcdef	99.25 ab
	C ₂ (2)	97.75 abcdef	97.50 abcdefg	98.75 abc
	C ₃ (3)	97.75 abcdef	97.50 abcdefg	97.75 abcdef
	C ₄ (4)	97.00 abcdefg	96.00 bcdefghi	97.00 abcdefg
	C ₅ (5)	95.50 cdefghi	95.75 bcdefghi	96.75 abcdefgh
	C ₆ (6)	95.50 cdefghi	94.50 efghi	96.00 bcdefghi
10 (A)	C ₀ (0)	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	C ₁ (1)	97.75 abc	98.00 abcdef	98.50 abcd
	C ₂ (2)	97.50 abc	96.75 abcdefgh	98.00 abcdef
	C ₃ (3)	95.50 bcdefgh	96.00 bcdefghi	96.50 abcdefgh
	C ₄ (4)	95.50 bcdefgh	95.25 cdefghi	95.75 bcdefghi
	C ₅ (5)	95.38 cdefgh	95.00 cdefghi	95.50 cdefghi
	C ₆ (6)	95.00 cdefghi	92.50 ijk	95.25 cdefghi
12 (A)	C ₀ (0)	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	C ₁ (1)	95.75 bcdefghi	98.00 abcdef	98.25 abcde
	C ₂ (2)	95.50 cdefghi	94.75 efghi	97.25 abcdefg
	C ₃ (3)	94.50 efghi	93.25 hij	96.50 abcdefgh
	C ₄ (4)	94.25 fghi	92.75 ij	93.25 hij
	C ₅ (5)	94.00 ghij	92.50 ijk	92.75 ij
	C ₆ (6)	89.50 kl	87.75 l	90.75 jkl

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT 5%

Tabel 4. Pengaruh kadar air awal, kemasan dan lama simpan terhadap vigor (koefisien kecepatan berkecambah /CVG) benih kedelai

Kadar Air (%)	Lama simpan (bln)	K e m a s a n		
		Plastik P (B)	K. terigu (B)	Al. Foil (B)
8 (A)	C ₀ (0)	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	C ₁ (1)	97.75 abc	97.50 abc	98.75 ab
	C ₂ (2)	97.50 abc	96.25 bcdef	97.75 abc
	C ₃ (3)	95.50 bcdefgh	96.00 bcdefg	97.00 abcd
	C ₄ (4)	95.50 bcdefgh	95.75 bcdefgh	97.00 abcd
	C ₅ (5)	95.38 cdefgh	95.50 bcdefgh	96.00 bcdefg
	C ₆ (6)	95.00 cdefghi	91.50 jk	95.00 cdefghi
10 (A)	C ₀ (0)	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	C ₁ (1)	97.63 abc	96.25 bcdef	97.75 abc
	C ₂ (2)	97.50 abc	95.63 bcdefgh	97.13 abcd
	C ₃ (3)	96.50 bcde	95.00 cdefgh	96.13 cdef
	C ₄ (4)	96.00 bcdefg	95.50 bcdefg	95.75 bcdefgh
	C ₅ (5)	95.50 bcdefgh	95.13 cdefghi	95.50 bcdefgh
	C ₆ (6)	92.50 hij	92.50 hij	95.50 bcdefgh
12 (A)	C ₀ (0)	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	C ₁ (1)	95.63 bcdefgh	97.25 abcd	98.00 abc
	C ₂ (2)	95.25 cdefgh	96.38 defghij	94.00 defghij
	C ₃ (3)	93.25 efghij	93.25 efgij	92.75 hij
	C ₄ (4)	93.13 fghij	95.75 bcdefgh	92.75 ghij
	C ₅ (5)	93.25 efghij	92.00 ij	92.75 ghij
	C ₆ (6)	89.13 kl	87.75 l	89.00 kl

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT 5%

Pembahasan

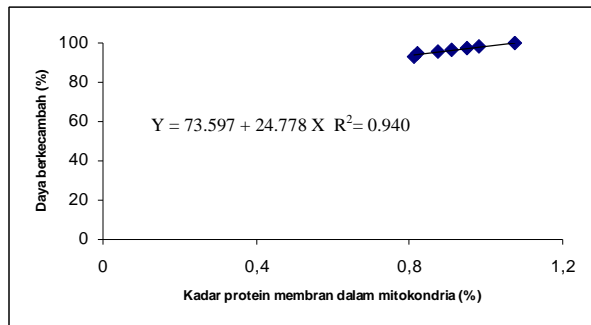
Benih kedelai memiliki kadar protein dan lemak, masing-masing sebesar 37% - 40% dan 25% - 27% (Ferguson *et al*, 1990). Protein bersifat higroskopis sehingga akan mengabsorpsi air lebih banyak jika benih disimpan di dalam kantong terigu. Salah satu faktor yang memungkinkan benih mengabsorpsi air dari lingkungannya adalah komposisi kimia benih, antara lain protein (Justice dan Bass, 1990). Peningkatan kadar air benih menyebabkan hidrolisis protein dan fluiditas membran mitokondria berkurang sehingga merubah bentuk protein yang terikat pada bilayer lipid (Reed, 1997). Selain itu, kadar protein membran dalam mitokondria benih kedelai selama penyimpanan menurun (Tabel 1). Menurut Sun dan Leopold (1997), meningkatnya kadar air benih dan kelembaban menyebabkan kerusakan protein meningkat. Kerusakan protein ditunjukkan oleh penurunan kadar maupun perubahan profilnya. Kadar air benih yang melebihi batas kritisnya akan menyebabkan kerusakan protein, diduga terbentuknya radikal bebas. Menurut Ross (1986), oksidasi gugus radikal bebas menghasilkan hidroperoksida yang dapat bereaksi dengan protein sehingga aktivitasnya menurun. Disamping itu dapat pula terjadi peningkatan beberapa hasil metabolit seperti asam lemak bebas dan gula reduksi yang selanjutnya

mengakibatkan kerusakan protein membran. Protein membran dalam mitokondria berperan dalam menjalankan fungsi membran, yaitu transpor dan konversi energi. Dengan demikian bila protein rusak maka akan mengurangi transpor energi yang menyebabkan deteriorasi benih. Selain penurunan kadar protein, perubahan protein dapat diamati secara kualitatif melalui pola pita protein (Gambar 1).

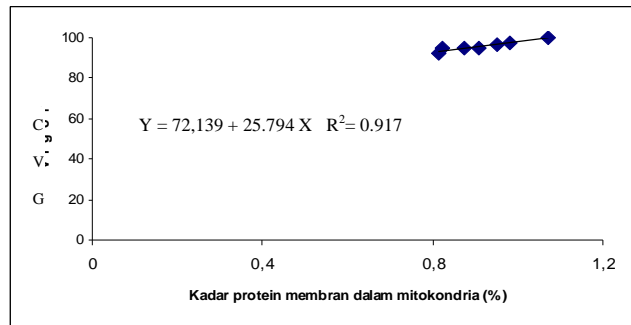
Hasil pengamatan secara elektroforesis menunjukkan bahwa ada 4 protein dalam jumlah yang banyak pada semua sampel, masing-masing pada 66.000 kDa, 54.429 kDa, 50.466 kDa dan 19,815 kDa. Jumlah band protein benih kontrol (K) dan benih yang disimpan dengan kadar air 8% didalam kantong plastik polietilen (A₁B₁) yang terdeteksi lebih banyak yaitu 14 band dibandingkan dengan band-band protein dari perlakuan lain. Berkurangnya jumlah band atau adanya band protein yang hilang (), yaitu sekitar 23.000 kDa dan 28.000 kDa pada A₃B₁; 23.000 kDa dan 28.000 kDa pada A₃B₃; 23.000 kDa, 28.000 kDa dan 29.000 kDa pada A₃B₂; 23.000 kDa pada A₂B₂; 23.000 kDa pada A₂B₃; 23.000 kDa pada A₁B₂ dan 23.000 kDa pada A₁B₃ disebabkan terjadinya degradasi protein sehingga fraksi protein berkurang. Hilangnya atau tidak adanya fraksi protein karena terjadi penggabungan beberapa fraksi protein kecil menjadi fraksi-fraksi protein besar, juga karena tidak terjadi sintesis protein. Fraksi protein

benih kontrol dan benih dari perlakuan A₁B₁ relatif lebih terpisah dibanding fraksi protein dari perlakuan lainnya. Hal ini diduga terjadi dekomposisi fraksi protein rantai besar menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Hasil analisis pola pita protein menunjukkan bahwa sudah terjadi degradasi yang berlanjut pada kerusakan protein. Menurunnya kadar maupun perubahan profil protein membran dalam mitokondria benih yang disimpan di dalam kantong terigu menunjukkan secara langsung bahwa integritas membran sel dan secara tidak langsung integritas membran mitokondria menurun. Penurunan integritas membran sel secara langsung dan integritas membran mitokondria secara tidak langsung dapat diindikasikan oleh peningkatan daya hantar listrik (Tabel 2). Yaya *et al.* (2003) menyatakan bahwa benih kedelai yang disimpan dengan kadar air 6%, 8%, 10% dan 12% masing-masing pada suhu 15°C, 20°C, 25°C dan 30°C selama 120 hari menunjukkan peningkatan DHL di atas 100 µmol g⁻¹ benih. Benih kedelai yang disimpan dengan kadar air 12% dalam kantong plastik polietilen dan kertas pada suhu 10°C, 20°C dan suhu gudang mengalami peningkatan DHL setelah disimpan selama 91 hari (TeKrony *et al.* 2001). Hal ini menunjukkan bahwa permeabilitas sel meningkat akibat ketidakteraturan membran. Ketidakteraturan membran sel menunjukkan membran sel rusak. Benih yang membran selnya rusak digolongkan benih yang mundur (Mayhew dan Caviness, 1994). Kerusakan membran sel menyebabkan disfungsi mitokondria yang menghasilkan penurunan sintesis fosfolipid mitokondria maupun peningkatan kerusakan fosfolipid mitokondria (Anonim, 2007). Selanjutnya dikatakan bahwa fosfolipid dan protein membran merupakan senyawa utama penyusun membran sel dan membran mitokondria. Dengan menurunnya kadar fosfolipid membran mitokondria dan rusaknya fosfolipid mitokondria menyebabkan protein yang tersusun bersama-sama dengan fosfolipid berkurang dan rusak, sehingga produksi ATP berkurang. Berkurangnya kadar atau rusaknya fosfolipid membran mitokondria juga disebabkan oleh asam lemak bebas yang dihasilkan oleh hidrolisis lemak jika kadar air benih tinggi memblokir Ca²⁺ fosfat dan K⁺ dalam mitokondria sehingga Ca²⁺ dan K⁺ menurun. Hal ini menyebabkan deteriorasi fungsi respirasi (Neil *et al.*, 2004). Deteriorasi fungsi respirasi menyebabkan energi dalam bentuk ATP berkurang, sehingga daya

berkecambah dan vigor menurun (Tabel 3 dan Tabel 4). Kadar protein membran dalam mitokondria berkorelasi positif dan sangat nyata dengan daya berkecambah (Gambar 2) dan vigor / CVG (Gambar 3). Rusaknya membran sel menyebabkan banyak senyawa yang bocor antara lain gula, asam amino dan lemak keluar sel. Irawati *et al.* (1997) menyatakan bahwa kandungan eksudat antara lain gula, asam amino dan lemak dalam air rendaman benih jagung meningkat seiring dengan makin lama benih disimpan. Dengan demikian substrat untuk respirasi berkurang, sehingga energi yang dihasilkan untuk berkecambah berkurang. Selain itu, energi metabolik untuk mekanisme transpor membran dan memelihara integritas seluler berkurang. Dengan demikian sel tidak dapat bermetabolisme dengan baik, sehingga perombakan cadangan makanan dan sintesis senyawa baru juga terganggu sehingga viabilitas menurun. Kerusakan membran mengakibatkan kebocoran hasil metabolisme ditegaskan lagi oleh Tang *et al.* (1999). Pengamatan pada sitoplasma benih jagung menunjukkan makin meningkatnya ketidakteraturan membran dengan makin mundurnya benih. Menurut Castillo *et al.* (2004) kebocoran hasil metabolisme pada benih *P. sativum* berkorelasi positif dengan kematian benih untuk berkecambah, antara lain disebabkan oleh penurunan integritas membran (Ross, 1986). Osborne dalam Bewley dan Black (1982) menyatakan bahwa faktor-faktor yang menentukan penurunan viabilitas benih, antara lain hilangnya integritas membran, kerusakan makromolekul, dan hilangnya kompartemensi seluler. Menurut Chai *et al.* (2002), perkecambahan benih kedelai akan menurun dari perkecambahan awal yaitu diatas 90% menjadi 0% tergantung spesies dan kadar air benih selama penyimpanan. Dilain pihak Yaya *et al.* (2003) menyatakan bahwa benih kedelai yang disimpan dengan kadar air 6% dan 8% selama 4 bulan pada suhu 15°C memiliki persentase perkecambahan di atas 70%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa telah terjadi perubahan protein membran dalam mitokondria yang menyebabkan deteriorasi benih kedelai selama penyimpanan namun deteriorasi masih relatif kecil, terbukti dari daya berkecambah dan vigor masih di atas 80% (batas kelulusan mutu benih yang umum diterapkan).



Gambar 2. Hubungan antara kadar protein membran dalam mitokondria (%) dengan daya berkecambah (%)



Gambar 3. Hubungan antara kadar protein membran dalam mitokondria (%) dengan vigor (CVG)

KESIMPULAN

1. Kadar air awal benih, kemasan dan lama simpan berpengaruh terhadap kadar protein membran dalam mitokondria serta pola pitanya.
2. Kadar protein membran dalam mitokondria yang tinggi menghasilkan daya berkecambah dan vigor benih kedelai tinggi, dan sebaliknya.
3. Integritas membran sel yang ditunjukkan oleh nilai DHL berpengaruh terhadap integritas mitokondria. Makin tinggi nilai DHL integritas membran mitokondria makin menurun.
4. Benih kedelai yang disimpan pada kadar air awal 8%, 10% dan 12% di dalam kantong aluminium foil dapat mempertahankan kadar protein yang tetap tinggi selama 6 bulan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2007. Membrane damage. <http://www.humphath.com/membrane.damage>. 4 p.
- Alberts, D. D., J. Bray, M. Lewis, K. Raff, J. D. Roberts, J. Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York and London. P. 234-267.
- Bewley, J.D., M. Black. 1982. Physiology and Biochemistry of Seed in Relation to Germination. Vol. II. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York. 37 p.
- Castillo, A.G., J.G Hampton, P. Coolbear. 2004. Effect of Sowing Date and Harvest Timing on Seed Vigour in Garden Pea (*Pisum sativum* L.). Seed Technology Centre Department of Plant Science, Massey University Palmerston North, New Zealand. 308 p.
- Chai, J., R. Ma., L. Li, Y. Du. 2002. Optimum Moisture Contents of Seed Agricultural Physics, Physiological and Biochemical. Institut Hebey Academy of Agricultural and Forestry Sciences. Shijiazhuang, China. 285 p.
- Day, D.A., J.B. Hanson. 1977. On methods for isolation of mitochondria from etiolated corn shoots. Plant Sci Lett. 11:99-104.
- Dickerson, H.W., T.G. Clark, R.C. Findy. 1989. Ichthyophtherus multifiliis membrane protein isolation protocol. J. Protozoology. 36 (2):159-164.
- Ferguson, J.M., D.M. TeKrony, D.B. Egli. 1990. Changes during early soybean seed and axis deterioration. II. Lipids. Crop Sci. 30:179-182.
- Heldt, H.W. 2003. Mitochondria. http://www.biology.uni_hamburg.de. 1p.
- Irawati, E., P. Yudono, D. Indradewa. 1997. The Roles of Organic Exudates on The Electrical Conductivity of Seed Soaking Water in The Viability Test of Corn Seeds (*Zea mays* L.). Ilmu Pertanian. Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta. 5 p.
- International Seed Testing Association. 1993. International rules for seed testing. Seed Sci. Technol. 2, Supplement, Rules.
- Justice, O.L., L.N. Bass. 1990. Prinsip dan Praktek Penyimpanan Benih. Penerbit CV Rajawali, Jakarta. 472 hal.
- Kozlowsky, T.T. 1972. Seed Biology. Vol. III. Academic Press, New York. 569 p.

- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farrar, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- McDonald, M.B.Jr, D.O. Wilson. 1979. An assessment of the standardization and ability of the ASA-610 to rapidly predict soybean germination. *J. Seed. Technol.* 4(2):1-12.
- McDonald, M.B, L.O. Copeland. 1995. *Principles of Seed Science and Technology*. Macmillan Publ.Coy, New York and Collier Macmillan Publ, London. 247 p.
- Mayhew, W.L., C.E. Caviness. 1994. Seed quality and yield of early planted, short season soybean genotype. *Agron. J.* 86:16-19.
- Neil, A.J. K. Miller., B. Olivia, J. Chopra. 2004. Mitochondria Membrane. <http://www.himpath.com>. 2 p.
- Reed, D. 1997. Mitochondrial damage. Newsletter Article Spring/Summer. 1p.
- Ross, E.E. 1986. Precepts of succesful seed storage. *In* M.B. Mc Donald and C.J. Nelson, (eds.), *Physiology of Seed Deterioration*. CSSA Special Publ. Number 11, Madison, Wisconsin. p. 1 – 26.
- Sheeler, P., D.E. Bianci. 1987. *Cell and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inch. New York. Printed in the United States of America. 704 p.
- Stryer, L. 1994. *Biochemistry*. Four Edition. Stanford University. W.H. Freeman Company, New York. 1065 p.
- Sun, W.Q., A.C. Leopold. 1997. Glassy state and seed storage stability: A Viability Equation Analysis. *Annals of Botany*. 74:601-604.
- Tang, S., D.M. TeKrony, D.B. Egli, P.L. Cornelius. 1999. Seed physiology, production and technology. *Survival Characteristics of Corn Seed During Storage. II. Rate of Seed Deterioration*. *Crop. Sci.* 39:1400-1406.
- TeKrony, D.M., R.D. Viera., D.B. Egli, M. Rucker. 2001. Electrical conductivity of soybean seeds after storage in several environments. *Seed Sci. Technol.* 29:99-608.
- Yaya, Y., S. Vearasilp., S. Phosupongi, E. Tpoweezik. 2003. Prediction of Soybean Seed Viablity and Quality in Relation to Seed Moisture Contents and Storage Temperature. Chaengmay University. *Development of Agronomy, Thailand*. 371 p.