

Fluoresen Klorofil Benih: Parameter Baru dalam Penentuan Mutu Benih

Seed Chlorophyll Fluorescence: A New Parameter in Quality Seed Testing

Mohamad Rahmad Suhartanto¹⁾

ABSTRACT

It has been shown that chlorophyll content of seeds was negatively correlated with germinability towards the end of maturation. Physiological maturity was achieved when the chlorophyll fluorescence reached a minimum. The presence of chlorophyll in seeds and its relation with the progress of seed maturation has gained renewed interest after the development of Laser Induced Fluorescence (LIF). This equipment is able to measure and analyze chlorophyll fluorescence in the seed instantaneously and non-destructively. The use of LIF makes it possible to perform physiological and biochemical assays after chlorophyll fluorescence measurement in the same seeds. Based on the results from some experiments as well as the literature, the role of chlorophyll in developing seeds is presented. The overall conclusion is that chlorophyll is required during seed development, but undesirable during maturation. We hypothesize that the presence of chlorophyll during seed maturation is undesirable since it is associated with lower quality, particularly lower seed longevity. Chlorophyll may also be a primary source of free radicals. Seed chlorophyll fluorescence was affected by endogenous abscisic acid, gibberellins and phytochrome. Light, temperature and relative humidity may also influence the chlorophyll fluorescence of seeds.

Key words: Chlorophyll, Fluorescence, Parameter, Seed testing

PENDAHULUAN

Mutu benih merupakan sebuah konsep yang kompleks yang mencakup sejumlah faktor yang masing-masing mewakili prinsip-prinsip fisiologi, misalnya daya berkecambah, viabilitas, vigor dan daya simpan. Hal ini menimbulkan kesulitan memperoleh penciri (*marker*) fisik, biokimia maupun molekular yang mampu menduga mutu benih. Lebih dari 15 tahun ini sejumlah proses biologi telah berhasil diidentifikasi yang kesemuanya itu berhubungan erat dengan mutu benih, seperti proses-proses replikasi DNA, perkembangan sel, degradasi endosperm, aktivitas enzim-enzim hidrolitik dan potensial air dalam hubungannya dengan perkembangan dan perkecambahan benih. Dalam tulisan ini akan diulas kemungkinan penggunaan fluoresen klorofil benih sebagai salah satu penciri fisik dan biokimia dalam penentuan mutu benih.

Secara alamiah dalam proses pemasakan atau penuaan tanaman adalah terjadinya degradasi klorofil yang dengan mudah dapat dilihat pada daun dan buah. Sebenarnya proses yang sama juga terjadi pada benih. Penelitian Kwong (1991) pada benih geranium

(*Pelargonium x hortorum*) menunjukkan bahwa benih yang masih hijau memiliki daya berkecambah yang rendah, namun kemampuan berkecambah benih-benih tersebut meningkat bila dikecambahkan dalam media yang mengandung nutrisi. Klorofil dalam benih sudah banyak diteliti pada benih rapeseed (*Brassica oleracea*) dalam kaitannya dengan produksi minyak. Minyak yang berasal dari benih yang mengandung klorofil tinggi akan rendah mutunya. Hingga kini, kaitan antara klorofil dalam benih dengan mutu benih (daya berkecambah, vigor, daya simpan dan lain-lain) belum banyak diteliti.

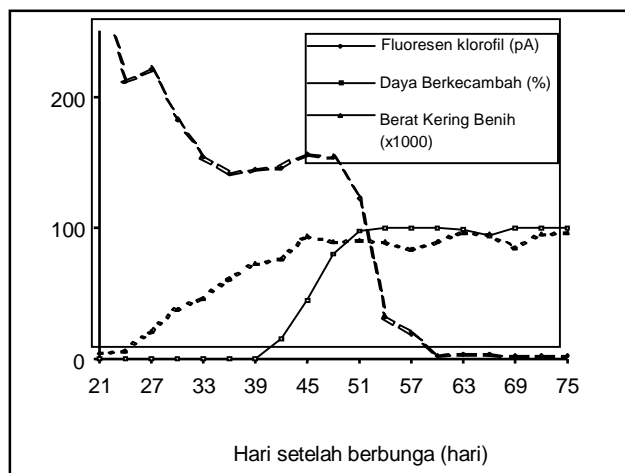
Jalink (1996) menemukan alat pemilah benih berdasarkan fluoresen dari klorofil. Alat (LIF: *Laser Induced Fluorescence*) ini mampu mendeteksi fluoresen dari klorofil dengan sensitifitas yang tinggi. Penemuan ini membangkitkan keinginan untuk menggali informasi tentang peranan klorofil dalam benih, karena keunggulan utama alat ini adalah selain sangat sensitif juga dalam proses pengukurannya tidak merusak benih. Setelah dianalisis benih dapat digunakan untuk kegiatan penelitian atau pengujian fisiologis dan biokimia lainnya. Berbeda dengan alat pemilahan benih berdasarkan warna (*color separator*)

¹⁾ Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian IPB
Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor. Telp/Fax. (0251) 629353.
E-mail: m.r.suhartanto@ipb.ac.id

lainnya yang hanya mampu memilah benih bila dalam lot benih tersebut memiliki perbedaan yang jelas dan menyolok (biasanya bisa dibedakan dengan mata), alat pengukur dan pemilah benih berdasarkan fluoresen klorofil ini mampu memilah benih yang memiliki perbedaan warna (hijau/klorofil) yang sangat kecil yang tidak mampu diamati dengan mata telanjang, seperti pada benih tomat, cabe, kubis, wortel dan lain-lain. Benih-benih ini sangat sulit dipisahkan karena pada periode pemasakan memiliki ukuran, bentuk dan berat yang relatif sama. Karena relatif merupakan parameter baru, fluoresen dari klorofil benih diharapkan dapat bersinergi dengan parameter fisiologis lainnya untuk mengungkap masalah mutu benih.

Fluoresen Klorofil sebagai Penciri Mutu Benih: Kasus Benih Tomat

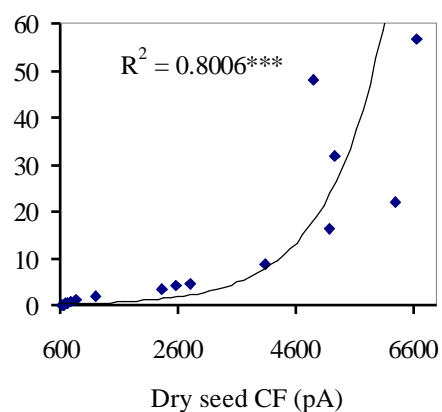
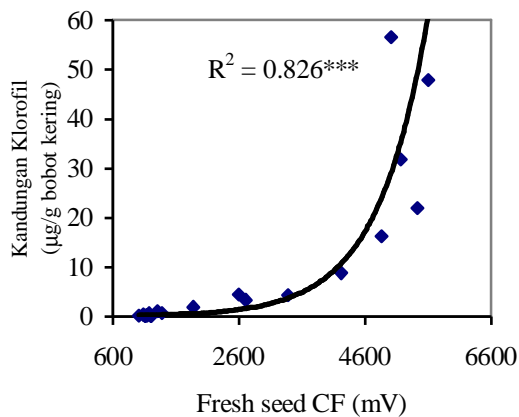
Kandungan klorofil pada benih tomat berkorelasi negatif dengan daya berkecambahnya (Gambar 1). Masak fisiologis yang dicerminkan oleh daya berkecambah mencapai maksimum pada saat kandungan klorofil mencapai minimum. Mutu benih sangat ditentukan oleh tingkat kemasakan benih tersebut, sehingga dapat dikatakan juga bahwa kandungan klorofil benih juga menentukan mutu benih tersebut.



Gambar 1. Maksimum daya berkecambah dan berat kering benih terjadi saat fluoresen dari klorofil benih mencapai minimum (Suhartanto, 2002).

Dengan menggunakan LIF tingkat kemasakan benih tersebut dengan mudah dapat ditentukan, karena fluoresen benih tomat berkorelasi secara eksponensial dengan kandungan klorofilnya, baik pada benih segar

(basah) maupun kering (Gambar 2). Jalink *et al.* (1998) juga mendapatkan bahwa mutu benih kubis meningkat saat fluoresen dari klorofil dalam benihnya menurun.



Gambar 2. Kandungan klorofil benih kering dan basah berkorelasi secara eksponensial dengan fluoresen klorofilnya selama periode pembentukan benih (21-75 hari setelah berbunga; Suhartanto, 2002).

Beberapa Faktor yang Mempengaruhi Kandungan Klorofil Benih

Sejumlah faktor-faktor abiotik yang mempengaruhi degradasi klorofil dalam benih ialah temperatur, cahaya dan kelembaban. Wards *et al.* (1992) melaporkan bahwa kandungan klorofil benih rapeseed (*Brassica oleraceae*) menurun pada saat masak, dan laju penurunan tersebut lebih rendah bila suhu lingkungan rendah. Johnson-Flanagan *et al.* (1994) menunjukkan bahwa benih canola (*Brassica napus*) yang ditempatkan pada kelembaban 97% menghasilkan penurunan laju pigments (termasuk klorofil) sampai 25%. Penelitian pada benih rapeseed menunjukkan penurunan kandungan klorofil pada benih seiring dengan penurunan kadar air benih tersebut (Johnson-Flanagan dan McLachlan, 1990a, b).

Mekanisme cahaya mempengaruhi kandungan klorofil masih belum jelas, karena diketahui bahwa cahaya dapat menghambat atau mempercepat proses degradasi klorofil (Biswal dan Biswal, 1984). Pada daun padi, degradasi klorofil dihambat oleh penyinaran yang kontinyu dengan intensitas rendah ($0.5 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{detik}^{-1}$), namun dengan intensitas lebih dari $10 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{detik}^{-1}$ proses penghambatan tersebut berkurang atau laju degradasi klorofil meningkat (Okada *et al.*, 1992). Suhartanto (2002) melaporkan bahwa proses degradasi klorofil pada benih tomat masih terjadi meskipun benih sudah dikeringkan. Benih yang disimpan dalam ruang simpan dengan cahaya merah menurun kandungan klorofilnya, namun bila disimpan di ruang gelap kandungan klorofilnya relatif tetap. Hal yang menarik ialah daya simpan benih tomat dalam ruangan dengan cahaya merah lebih baik dibanding di ruang gelap. Diduga klorofil dari benih dapat menjadi sumber radikal bebas yang dapat mempercepat penurunan viabilitas benih.

Benih tomat hasil pertanaman musim semi memiliki kandungan klorofil yang lebih rendah dibanding hasil musim gugur (Suhartanto, 2002). Intensitas cahaya dan panjang hari diduga mempengaruhi perbedaan kandungan klorofil benih-benih tersebut. Suhartanto (2002) juga melaporkan bahwa degradasi klorofil benih yang berasal dari buah berukuran kecil terjadi lebih cepat dibanding buah berukuran besar. Secara umum telah diketahui bahwa cahaya mengendalikan perkembangan kloroplas. Perubahan kualitas cahaya mengakibatkan perubahan keseimbangan ekspresi gen kloroplas pada fotosistem I dan II (Pfannschmidt *et al.*, 1999). Pada daun *Arabidopsis thaliana*, intensitas cahaya tinggi akan mengurangi jumlah thylakoid granal per kloroplas,

proporsi klorofil b terhadap klorofil a, dan akumulasi dari polipeptida utama LHC (Weston *et al.*, 2000).

Asam absisat (ABA) dan giberelin (GAs) sangat berperan dalam perkembangan benih (Bewley dan Black, 1994). ABA dan GA endogen mempengaruhi kandungan klorofil benih. Benih tomat yang defisien GA memiliki kandungan klorofil yang lebih tinggi dibanding tetuanya (*wild type*), sedangkan benih yang defisien ABA memiliki kandungan klorofil paling rendah (Suhartanto, 2002). Hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh adanya hubungan proses biosintesis ABA, GAs dan klorofil. Defisiensi GAs setelah terjadinya hambatan dalam tahap spesifik dalam biosintesis GA akan mengakibatkan peningkatan pigmentasi, baik klorofil maupun karotenoid. Lebih lanjut Maluf *et al.* (1997) menunjukkan bahwa pada mutan benih jagung yang defisien ABA juga akan mengalami defisiensi klorofil dan karotenoid. Mereka juga menunjukkan bahwa mutan ini memiliki ekspresi geranyl-geranyl pirofosfat sintase yang rendah. Enzim ini bertanggung jawab dalam proses sintesis geranyl-geranyl pirofosfat, yang merupakan precursor dari ABA, karotenoid dan klorofil. Lebih lanjut dilaporkan bahwa benih mutan yang memiliki kandungan fitokrom rendah (*phytochrome defisient mutant*) akan memiliki kandungan klorofil yang rendah pula dan benih dari mutan ini memiliki dormansi yang tinggi.

Peran Klorofil dalam Benih

Sedikit sekali informasi tentang peran dan fungsi klorofil dalam benih. Sugimoto *et al.* (1987) menunjukkan bahwa benih kedelai yang sedang tumbuh memiliki aktivitas fotosintesis. Hilangnya kemampuan untuk berfotosintesis diduga disebabkan oleh menurunnya intensitas cahaya yang dapat mencapai kloroplas benih akibat terjadinya akumulasi zat-zat cadangan makanan selama periode pemasakan benih.

Suhartanto (2002) juga membuktikan bahwa benih tomat memiliki aktivitas fotosintesis *in vitro* sampai dengan 40 hari setelah berbunga. Lebih lanjut juga ditunjukkan bahwa bila buah tomat ditumbuhkan dalam kondisi gelap akan menghasilkan benih dengan kualitas rendah dibandingkan bila buah tersebut tumbuh dalam kondisi penyinaran cahaya alami. Benih dari buah yang tumbuh di tempat gelap akan memiliki masa dormansi yang lebih lama. Fungsi klorofil dalam benih diduga sangat berhubungan dengan proses evolusi seperti yang ditunjukkan oleh Suhartanto (2002) bahwa benih-benih tomat yang berasal dari turunan varietas liar memiliki kandungan

klorofil dan aktivitas fotosintesis yang lebih tinggi dibanding varietas yang telah dibudidayakan. Hal ini merupakan indikasi bahwa kandungan klorofil dan fungsinya mengalami penurunan selama proses domestikasi. Li *et al.* (2000) berhipotesis bahwa selama proses evolusi, protein kompleks pemanen cahaya (LHC atau *light-harvesting complex protein*) dengan fungsi sebagai *photoprotective* muncul terlebih dahulu dibanding dengan fungsinya sebagai pemanen cahaya (fotosintesis).

Fungsi klorofil tampaknya berperan dalam proses embriogenesis. Apuya *et al.* (2001) membuktikan bahwa pertumbuhan normal embrio *Arabidopsis thaliana* membutuhkan kloroplas yang normal pula. Mutasi pada gen *chaperonin-60 α* , gen pengatur perkembangan kloroplas, akan menghasilkan embrio yang abnormal dan akan berkembang menjadi kecambah yang abnormal pula. Singal *et al.* (1987) dan Asokanthan *et al.* (1997) menduga bahwa pada benih canola (*Brassica campestris*) yang sedang berkembang, klorofil berguna dalam proses fotosintesis untuk menghasilkan ATP dan NADPH, yaitu energi yang dibutuhkan untuk mengkonversi suplai sukrosa dari tanaman menjadi asam lemak yang berguna dalam sintesis dan penyimpanan minyak dalam benih.

Berdasarkan berbagai informasi di atas dapat disimpulkan bahwa: (1) klorofil dibutuhkan dalam pembentukan benih, namun sangat tidak diharapkan dalam tahap pemasakan; (2) kehadiran klorofil dalam tahap pemasakan tampaknya berhubungan erat dengan rendahnya mutu benih, khususnya daya simpannya; (3) fluoresen klorofil benih dapat digunakan sebagai indikator masak fisiologis benih.

DAFTAR PUSTAKA

- Apuya, N. R., R.Yadegari, R.L. Fischer, J.J. Harada, J.L. Zimmerman, R.B. Goldberg. 2001. The *Arabidopsis* embryo mutant *schlepperless* has a defect in the Chaperonin-60 α gene. *Plant Physiol.* 126: 717-730.
- Asokanthan, P. S., R.W. Johnson, M. Griffith, M. Krol. 1997. The photosynthetic potential of canola embryos. *Physiol. Plant.* 101: 353-360.
- Bewley, J.D., M. Black. 1994. *Seeds, Physiology of Development and Germination* (Second Edition). Plenum Press, New York and London.
- Biswal, U. C., B. Biswal. 1984. Photocontrol of leaf senescence. *Photochem. Photobiol.* 39: 875-879.
- Jalink, H. 1996. Werkwijze voor het bepalen van de rijpheid en kwaliteit van zaden middels het chlorofylgehalte en enrichting voor het selecteren van zaden met behulp van een dergelijke werkwijze. Dutch Patent No. 1002984.
- Jalink, H., R. Van der Choor, A. Frandas, J.G. Van Pijlen, R.J. Bino. 1998. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for maturity and seed performance. *Seed Sci. Res.* 8: 437-443.
- Johnson-Flanagan, A. M., L.L.D. Maret, M.K. Pomeroy. 1994. Humidification of green canola seed leads to pigment degradation in the absence of germination. *Crop Sci.* 34: 1618-1623.
- Johnson-Flanagan, A. M., G. McLachlan. 1990a. Peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in degreening canola (*Brassica napus*) seeds and its inhibition by sublethal freezing. *Physiol. Plant.* 80: 453-459.
- Johnson-Flanagan, A. M., G. McLachlan. 1990b. The role of chlorophyllase in degreening canola (*Brassica napus*) seeds and its activation by sublethal freezing. *Physiol. Plant.* 80: 460-466.
- Kwong, F. Y. 1991. Research needs in the production of high quality seeds. In: Prakash, J., R.L.M. Pierik. (eds.) *Horticulture-New Technologies and Applications*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p.13-20.
- Li, X.-P., O. Bjorkman, C. Shih, A.R. Grossman, M. Rosenquist, S. Jansson, K.K. Niyogi. 2000. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395.
- Maluf, M. P. , I.N. Saab, E.T. Wurtzel, M.M. Sachs. 1997. The *viviparous12* maize mutant is deficient in abscisic acid, carotenoids and chlorophyll synthesis. *J. Exp. Bot.* 48: 1259-1268.
- Okada, K., Y. Inoue, K. Satoh, S. Katoh. 1992. Effect of light on degradation of chlorophyll and protein during senescence of detached rice leaves. *Plant Cell Physiol.* 33: 1183-1191.
- Pfannschmidt, T., A. Nilson, J.F. Allen. 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397: 625-628.

- Singal, H.R., I.S. Sheoran, R. Singh. 1987. Photosynthetic carbon fixation characteristic of fruiting structures of *Brassica campestris* L. Plant Physiol. 83: 1043-1047.
- Sugimoto, T., K. Tanaka, M. Momma, K. Saio. 1987. Photosynthetic activity in the developing cotyledon of soybean seeds. Agric. Biol. Chem. 51: 1227-1230.
- Suhartanto, M.R. 2002. Chlorophyll in tomato seeds: marker for seed performance?. (Dissertation). Wageningen University, The Netherlands.
- Ward, K., R. Scarth, J.K. Daun, J.K. Vessey. 1992. Effects of genotype and environment on seed chlorophyll degradation during ripening in four cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*). Can. J. Plant Sci. 72:643-649.
- Weston, E., K. Thorogood, G. Vinti, E. Lopez-Juez. 2000. Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants. Planta 211: 807-815.