

Pengembangan Uji Tetrazolium sebagai Metode Analisis Vigor Benih Botani Bawang Merah

(Development of Tetrazolium Test as Vigor Analysis Method of True Seed of Shallot)

Nurul Afifah¹, Eny Widajati^{2*}, dan Endah Retno Palupi²

Diterima 5 Juni 2020/Disetujui 8 Agustus 2020

ABSTRACT

The tetrazolium (TZ) test is one of methods to estimate viability and vigor of seed. This study aimed to improve the methodology of vigor analysis of true seed of shallot. In this research, two varieties of shallot seeds were used, those were Trisula and Tuk-tuk. Pre-treatment in the tetrazolium test of shallot seeds was applied, directly soaking in water for 18 hours. Seed preparation before staining used method: the thoroughly linear side of the seed was cut longitudinally as the only thin slice, and convex side of seed was punctured with a scalpel. Seeds were stained for 18 hours in a 1% tetrazolium solution at 30 °C. Seed patterns classified in four categories were determined. The results were four patterns of high-seedling as criteria for seed vigor, five patterns of low seedling vigor, seven patterns of abnormal seedling, and four patterns of dead seed. Viability and vigor physiological parameters are closely correlated with the results of high seedling vigor patterns. The high seedling vigor patterns had high the correlation coefficients (r) with physiological test parameters in the laboratory including vigor index ($r = 0.882$), normal seedling dry weight ($r = 0.899$), and seed growth rate ($r = 0.875$). It indicated the vigor staining patterns can predict the vigor of seeds.

Keywords: Allium cepa, imbibition, seed quality, viability, true shallot seed

ABSTRAK

Uji tetrazolium (TZ) merupakan salah satu metode untuk mengestimasi viabilitas dan vigor benih. Penelitian ini bertujuan untuk memperbaiki metode analisis vigor pada benih botani bawang merah. Pada penelitian ini digunakan dua varietas benih bawang merah, yaitu Trisula dan Tuk-tuk. *Pre-treatment* dalam uji tetrazolium benih bawang merah dilakukan dengan perendaman benih dalam air selama 18 jam. Sebelum pewarnaan benih disiapkan dengan menggores sisi lurus secara longitudinal sebagai satu-satunya irisan tipis, dan sisi cembung benih ditusuk dengan *scalpel*. Benih diwarnai selama 18 jam dalam larutan tetrazolium pada suhu 1% suhu 30 °C dalam kondisi gelap. Pola pewarnaan benih diklasifikasikan dalam empat kategori yaitu empat pola normal kuat sebagai kriteria benih vigor, lima pola normal lemah, tujuh pola abnormal, dan empat pola benih mati. Parameter fisiologis viabilitas dan vigor berkorelasi erat dengan hasil pola vigor/ normal kuat. Pola normal kuat memiliki koefisien korelasi (r) yang tinggi dengan parameter uji fisiologis di laboratorium termasuk indeks vigor ($r = 0.882$), bobot kering kecambah normal ($r = 0.899$), dan kecepatan tumbuh ($r = 0.875$). Hal ini mengindikasikan pola pewarnaan vigor dapat memprediksi vigor benih.

Kata kunci: Allium cepa, benih botani, imbibisi, mutu benih, viabilitas

¹Balai Besar Pengembangan Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura
Jl. Raya Tapos, Kotak Pos 20, Tapos, Depok, Jawa Barat 16957, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor, Jawa Barat 16680, Indonesia

E-mail : eny_widajati@apps.ipb.ac.id (*penulis korespondensi)

PENDAHULUAN

Bawang merah (*Allium cepa* var. *ascolanicum* B.) merupakan komoditas hortikultura yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Pada tahun 2017 produktivitas bawang merah sebesar 9.29 ton ha⁻¹, kemudian tahun 2018 mengalami penurunan menjadi 9.06 ton ha⁻¹ (BPS 2019). Penurunan produktivitas tersebut salah satunya diduga karena rendahnya penggunaan benih umbi bermutu. Pemerintah terus melakukan upaya peningkatan produksi bawang merah salah satunya dengan strategi percepatan ketersediaan benih bermutu yaitu dengan memperkenalkan benih botani atau disebut juga *true seed of shallot* (TSS).

Beberapa kelebihan penggunaan TSS sebagai benih yaitu: sifat benih yang jarang terkontaminasi virus, cendawan, bakteri dan nematoda, benih dapat disimpan lebih lama, kebutuhan benih sedikit 3-7.5 kg ha⁻¹, dan potensi produktivitas lebih dari 20 ton ha⁻¹ (Prayudi *et al.*, 2015). Berdasarkan deskripsi varietas bawang merah beberapa di antaranya varietas Trisula dan Tuk-tuk memiliki potensi produksi mencapai 23 ton ha⁻¹ dan 32 ton ha⁻¹. Nilai potensi produksi tersebut sangat tinggi dibandingkan dengan nilai produktivitas bawang merah di Indonesia saat ini yang hanya berkisar 9 ton ha⁻¹, oleh karena itu, mutu TSS perlu diperhatikan pada saat panen maupun masa penyimpanan sebagai *quality control*.

Informasi mutu suatu lot benih diperoleh melalui serangkaian pengujian benih. Uji daya berkecambah merupakan salah satu uji standar yang rutin digunakan. Nilai daya berkecambah dicantumkan dalam label benih bersertifikat yang menggambarkan viabilitas benih, tetapi kurang sensitif dalam membedakan lot benih. Sementara uji vigor menghasilkan informasi indeks mutu benih yang lebih sensitif dan menggambarkan potensi performa tingkat lot benih yang lebih konsisten (ISTA, 2016). Vigor benih adalah sifat-sifat benih yang menggambarkan performa lot benih pada kisaran kondisi lingkungan yang luas (ISTA, 2016), oleh karena itu diperlukan metode pengujian vigor untuk memperoleh informasi vigor/mutu suatu benih dari berbagai aspek yaitu: fisiologis, fisik, resisten/cekaman, dan biokimia.

Beberapa metode uji vigor pada *Allium cepa* yang sudah dikembangkan yaitu:

pengusangan cepat, deteriorasi terkendali, dan uji konduktivitas (Rodo dan Marcos-Filho 2003; Dias *et al.* 2006). Pada metode pengusangan cepat maupun deteriorasi terkendali menggunakan perlakuan inkubasi, dilanjutkan tahapan evaluasi perkecambahan yang memakan waktu yang cukup lama. Uji konduktivitas hanya efektif pada beberapa spesies, hal ini salah satunya dipengaruhi oleh *semipermeable nucellar membrane* (Elias *et al.*, 2012).

Uji tetrazolium (TZ) dapat mengestimasi mutu benih dari aspek biokimia yaitu berdasarkan aktivitas enzim *dehydrogenase*. Uji TZ menggunakan larutan 2,3,5 *triphenyl tetrazolium chloride* yang diimbibisikan pada benih kemudian bereaksi dengan enzim *dehydrogenase* dalam jaringan benih sehingga terbentuk endapan formazan berwarna merah sebagai indikator bahwa jaringan tersebut masih hidup. Pola pewarnaan dan intensitas warna struktur internal benih menentukan dalam evaluasi kriteria sebagai benih yang vigor yang memiliki potensi berkembang menjadi kecambah yang normal (ISTA, 2016). Kelebihan uji TZ di antaranya: tidak terpengaruh oleh faktor lingkungan, dapat mendeteksi kemunduran benih, alat yang dibutuhkan sederhana, waktu yang dibutuhkan cepat, tidak dipengaruhi faktor dormansi, dan fokus evaluasi pada struktur benih. Kekurangan dari pengujian ini membutuhkan keterampilan dan pengetahuan yang khusus, dan tingkat subjektivitas pada evaluasi pewarnaan (Franca-Neto dan Krzyzanowsky, 2019).

Beberapa kajian memberikan hasil bahwa uji TZ mampu menilai vigor benih dan berpotensi untuk dijadikan metode pengujian vigor secara cepat pada beberapa spesies yaitu: kapas, kacang tanah, jagung, kedelai, dan tomat (Marcos-Filho, 2015; Dina, 2007; Santos *et al.*, 2007). *International Seed Technology Association* (ISTA) (2003) telah menetapkan uji tetrazolium pada *Allium* spp. sebagai uji viabilitas dengan dua kriteria pola pewarnaan yaitu *viable* dan *non-viable*. Pola *viable* yang dimaksud belum menggambarkan atau mengestimasi vigor pada *Allium* spp. Oleh karena itu perlu dicari pola *viable*-vigor dengan kriteria yang lebih ketat. Pada penelitian yang dilakukan oleh Abdullah (2017) uji TZ pada benih bawang merah menghasilkan pola-pola topografi kriteria

normal kuat memiliki nilai koefisien korelasi yang tinggi dengan parameter indeks vigor, dan daya berkecambah. Akan tetapi masih ada yang perlu diperbaiki yaitu metode *pre-treatment* dan bagian-bagian internal benih yang diamati dalam penentuan pola topografi.

Berdasarkan hal-hal tersebut perlu dilakukan pengembangan metode analisis vigor benih botani bawang merah dengan menggunakan uji tetrazolium. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan pola topografi pewarnaan tetrazolium sebagai kriteria benih vigor dan mendapatkan informasi hubungan antara hasil pengujian vigor di laboratorium.

BAHAN DAN METODE

Penelitian terdiri atas dua percobaan yaitu : (1) penetapan lama perendaman benih untuk *pre-treatment* uji tetrazolium, dan (2) penentuan kriteria benih vigor berdasarkan pola topografi pewarnaan tetrazolium.

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2018 s.d. Agustus 2019 di laboratorium Balai Besar Pengembangan Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura, Depok.

Bahan

Lot benih yang digunakan terdiri atas dua varietas yaitu varietas Trisula dan Tuk-tuk. Benih varietas Trisula TR1 (DB= 82%) diproduksi oleh Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Benih varietas Tuk-tuk berasal dari produsen swasta yaitu: Lot TA (DB=84%), T1 (DB= 85%), T2 (DB= 83%), T3 (DB= 65%), dan T4 (DB= 60%). Lot benih T2, T3, dan T4 diperoleh dengan proses *artificial aging* dengan penderaan suhu 40-41 °C dan RH tinggi selama 2-6 hari.

Percobaan 1: Penetapan lama Perendaman Benih untuk Pre-treatment Uji Tetrazolium

Uji tetrazolium terdiri atas beberapa tahapan yaitu: *pre-treatment*, persiapan benih sebelum pewarnaan berupa pelukaan atau

pemotongan, pewarnaan, dan evaluasi pola topografi. Penggunaan lama waktu perendaman yang tepat untuk *pre-treatment* pada uji tetrazolium akan menghasilkan pola topografi pewarnaan yang lebih informatif terkait viabilitas maupun vigor benih yang diuji. Penetapan lama perendaman benih untuk tahapan *pre-treatment* didasarkan pada aktivasi metabolisme benih, struktur internal benih, dan waktu *radicle emergence*.

Prosedur Percobaan

a. Aktivasi metabolisme benih

Aktivasi metabolisme benih dilakukan dengan perlakuan perendaman yang akan diamati proses imbibisinya. Pengamatan proses imbibisi terdiri atas dua metode yaitu penambahan bobot dan peningkatan kadar air benih.

Pengukuran imbibisi berdasarkan penambahan bobot menggunakan lot benih Trisula (TR1) dan Tuk-tuk (TA). Benih disiapkan sebanyak 1.5 g direndam dalam 20 ml aquades pada gelas piala untuk periode waktu perendaman yaitu 0, 12, 18, 24, 30, dan 36 jam sebanyak 3 ulangan pada kondisi suhu 20±2 °C. Benih ditimbang dengan neraca analitik, kemudian benih direndam kembali sampai waktu periode berikutnya.

Pengukuran imbibisi berdasarkan penambahan kadar air benih menggunakan benih sebanyak 2 g direndam dalam 20 ml air pada gelas piala untuk perendaman dengan periode waktu perendaman yaitu 0, 12, 18, 24, 30, 36 jam sebanyak 3 ulangan pada kondisi suhu 20±2 °C. Benih yang sudah dikeringanginkan ditimbang dan diukur kadar airnya. Penetapan KA benih dilakukan dengan mengoven 1.5 g benih pada suhu 103±2 °C selama 17±1 jam menggunakan cawan porselen (ISTA, 2016).

b. Struktur internal benih

Benih TA direndam dalam 20 ml air sebanyak 50 butir pada gelas piala pada empat periode perendaman yaitu 12, 18, 24, 30, dan 36 jam dan diinkubasi pada kondisi suhu 20±2 °C. Benih diamati sebanyak 50 butir masing-masing periode perendaman. Pengamatan dilakukan dengan mengiris benih secara longitudinal untuk membuka bagian poros embrio, kemudian diamati menggunakan mikroskop stereo perbesaran 7-30 kali. Bagian yang diamati struktur internal benih yaitu:

radikula, kotiledon, *haustorium*, dan endosperma.

c. Penetapan waktu *radicle emergence* (RE)

Penetapan RE menggunakan empat lot benih varietas Tuk-tuk dengan beberapa tingkat viabilitas yang berbeda yaitu: lot T1, T2, T3, dan T4. Benih dikecambahkan dalam boks plastik tertutup, menggunakan metode uji di atas kertas/ *top of paper* (TP). Benih ditabur di atas media yang telah dilembabkan dengan air. Selanjutnya diinkubasi pada *germinator room* pada suhu 20 ± 2 °C selama 120 jam. Pengecambahan dilakukan dengan empat ulangan masing-masing 100 butir. Pengamatan dilakukan per enam jam selama 120 jam setelah penanaman pada media. *Radicle emergence* dihitung berdasarkan persentase jumlah benih yang berkecambah dengan kriteria panjang radikula minimal 2 mm.

Percobaan 2: Penentuan Kriteria Benih Vigor Berdasarkan Pola Topografi Pewarnaan Tetrazolium

Prosedur Percobaan

a. Pengujian tetrazolium

Lot benih yang digunakan sebanyak empat lot benih varietas Tuk-tuk yaitu: Lot T1, T2, T3, dan T4. Pada pengujian TZ, benih sebanyak 100 butir sebanyak empat ulangan direndam dengan aquades pada suhu 20 ± 2 °C dengan waktu perendaman selama 18 jam (hasil percobaan 1). Kemudian benih digores tipis pada bagian sisi/penampang yang datar, dan tusuk bagian sisi cembung secara longitudinal dekat pada bagian tengah benih diantara radikula dan kotiledon. Selanjutnya benih direndam dalam larutan tetrazolium klorida 1% dalam buffer fosfat selama 18 jam, pada suhu 30 °C dan kondisi gelap (ISTA 2016).

Pengamatan dilakukan dengan mengelompokkan benih berdasarkan pola topografi dan pewarnaan yang terbentuk. Fokus pengamatan dilakukan pada bagian struktur internal benih bawang merah berdasarkan intensitas dan lokasi pewarnaan dengan bantuan mikroskop stereo. Kelompok pola benih terdiri atas empat kriteria yaitu: (1) benih *viable*-vigor yang ditunjukkan dengan pola normal kuat, (2) benih *viable*-tidak vigor yang ditunjukkan pola normal lemah, benih

non-viable yang ditunjukkan dengan (3) pola abnormal dan (4) mati. Topografi pewarnaan dilihat dengan menggunakan mikroskop. Kemudian masing-masing pola dihitung dan dipersentasekan.

b. Pengujian viabilitas dan vigor dengan pendekatan fisiologis

Pengujian fisiologis dilaksanakan dengan menggunakan metode uji di atas kertas/ *top of paper* menggunakan boks plastik berukuran 14 cm x 9 cm x 5 cm (Madyasari *et al.*, 2017). Benih yang digunakan sebanyak 100 butir setiap ulangan, setiap lot benih terdiri atas empat ulangan dan diinkubasi pada *germinator room* pada suhu 20 ± 2 °C selama 12 hari (ISTA, 2016). Pengujian fisiologis meliputi beberapa tolok ukur yaitu: (a) indeks vigor (IV) merupakan persentase kecambah normal pada hitungan pertama yaitu hari ke-6 (Copeland dan McDonald, 1995), (b) kecepatan tumbuh (KCT) dihitung berdasarkan jumlah dari persentase kecambah normal per satuan etmal (24 jam) (Sadjad *et al.* 1999), (c) daya berkecambah (DB) yang dihitung berdasarkan persentase jumlah kecambah normal (KN) pada pengamatan ke-1 (hari ke-6) dan ke-2 (hari ke-12) (ISTA 2016), (d) potensi tumbuh maksimum (PTM) dihitung berdasarkan persentase keseluruhan kecambah yang tumbuh baik normal maupun abnormal sampai akhir pengamatan, dan (e) berat kering kecambah normal (BKKN) diperoleh dengan menimbang bobot kecambah normal yang tumbuh pada hari ke-6 pada uji perkecambahan di atas kertas pada suhu 80 °C selama 24 jam.

Rancangan Percobaan

Pengujian viabilitas dan vigor di laboratorium menggunakan rancangan acak lengkap dengan satu faktor yaitu tingkat viabilitas lot benih yang terdiri atas empat tingkat viabilitas dan empat ulangan. Setelah dianalisis sidik ragam dilakukan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada α 5%.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode analisis korelasi regresi antara nilai vigor berdasarkan uji fisiologi dengan nilai vigor yang diukur dengan tetrazolium. Sebagai

sumbu X adalah nilai vigor yang diukur dari pengujian tetrazolium sedangkan sumbu Y adalah nilai vigor dan viabilitas pendekatan fisiologis dengan tolok ukur IV, K_{CT} , BKKN, DB dan PTM. Nilai koefisien korelasi (r) digunakan untuk melihat keeratan hubungan antara nilai vigor dan viabilitas pendekatan fisiologis dengan nilai vigor berdasarkan pola pewarnaan tetrazolium.

HASIL DAN PEMBAHASAN

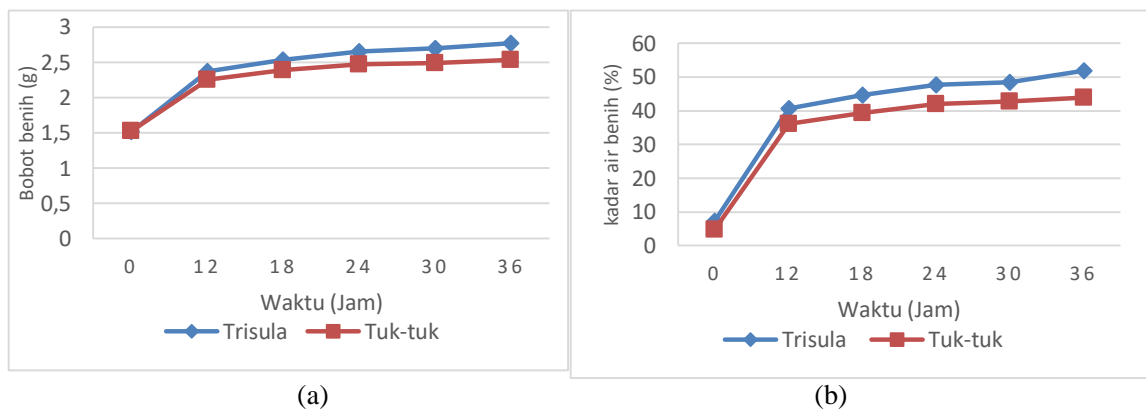
Percobaan 1: Penetapan Lama Perendaman Benih untuk Pre-Treatment Pengujian Tetrazolium

a. Aktivasi metabolisme benih
 Pengamatan imbibisi dilakukan selama 0-36 jam. Pengamatan pertama dilakukan pada 12 jam setelah perendaman dengan hasil terjadi peningkatan bobot yang sangat signifikan pada benih bawang merah varietas Trisula dan Tuk-tuk (Gambar 1a). Begitu juga pada pengamatan imbibisi berdasarkan kadar air, jam ke-12 setelah perendaman terjadi peningkatan kadar air Trisula dan Tuk-tuk secara signifikan. Kadar air awal Trisula sebesar 7.2% meningkat tajam menjadi 40.7%. Tuk-tuk juga mengalami peningkatan kadar air yang sangat signifikan yaitu 4.8% menjadi 36.2% (Gambar 1b). Pada pengamatan imbibisi berdasarkan bobot maupun kadar air benih menghasilkan lama

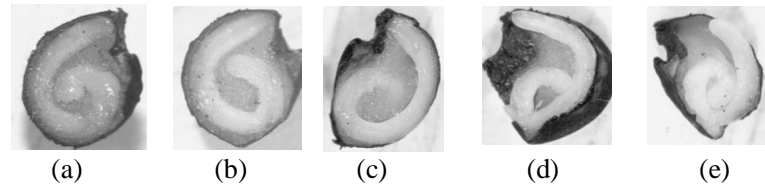
perendaman 12 s.d 36 jam merupakan waktu benih mencapai bobot dan kadar air yang maksimum dengan kenaikan yang mendekati stagnan.

b. Pengamatan struktural internal benih
 Struktur benih bawang merah yang diamati yaitu: radikula, kotiledon, haustorium dan endosperma. Radikula, dan kotiledon, yang diamati merupakan struktur yang esensial pada kecambah untuk berkembang menjadi tanaman normal. Endosperma dan haustorium merupakan bagian struktur internal benih berperan penting dalam proses perkecambahan benih.

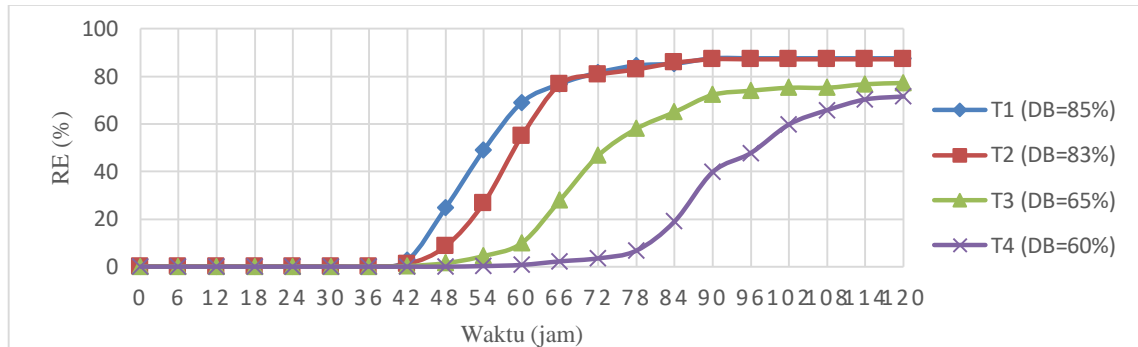
Pengamatan struktur internal benih dilakukan pada 12, 18, 24, dan 30 jam setelah perendaman untuk imbibisi. Pada perendaman 12 jam laju imbibisi berlangsung maksimum, ukuran benih membesar secara signifikan. Radikula belum ada yang menembus testa. Pada jam ke-18 benih relatif tidak berbeda, embrio mulai membesar radikula mulai memanjang. Pada jam ke-24 radikula memanjang mendekati testa, dan embrio terus membesar. Pada jam ke-30 endosperma mulai sedikit menyusut seiring tumbuh dan berkembangnya embrio, radikula semakin mendekati testa. Pada imbibisi jam ke-36 kondisi embrio dan endosperma tidak berbeda dengan jam ke-30 akan tetapi ukuran embrio semakin membesar (Gambar 1).



Gambar 1. Kurva pertambahan bobot benih (a), dan kadar air benih (b) pada imbibisi dengan lama 0 s.d 36 jam



Gambar 2. Perkembangan struktur internal benih bawang merah pada beberapa periode imbibisi yaitu 12 jam (a), 18 jam (b), 24 jam (c), 30 jam (d), dan 36 jam (e), (perbesaran 20 kali).



Gambar 3. Radicle emergence pada periode waktu selama 120 jam dari empat lot benih bawang merah di atas media kertas suhu 20 ± 2 °C

c. Pemunculan radikula/ radicle emergence (RE)

Gambar 3 menunjukkan pertambahan RE pada setiap interval 6 jam pengamatan mulai dari 0 s.d 120 jam setelah pengecambahan. Pada grafik tersebut memberikan informasi lag period masing-masing lot benih. Lot T1 dan T2 yang memiliki vigor dan viabilitas tinggi menghasilkan lag period yang singkat yaitu 42 jam, sebaliknya lot T3 dan T4 dengan vigor dan viabilitas yang rendah menghasilkan lag period yang lebih panjang yaitu 48 dan 60 jam. Benih yang memiliki vigor rendah membutuhkan waktu yang lebih lama untuk proses pemunculan radikula. Lag period yang lebih panjang dibutuhkan dalam proses perbaikan metabolisme, DNA dan proses enzimatik (Matthews dan Powell, 2011).

Pada lag period benih melakukan metabolisme aktif untuk mempersiapkan pemunculan radikula yaitu: sintesis protein, pematangan mitokondria, aktivasi enzim dan perombakan cadangan makanan (Copeland dan Mcdonald 1998). Lag period ditandai kenaikan bobot dan kadar air yang hampir stagnan atau stabil. Menurut Bradford (1990) proses perkecambahan benih dimulai dengan imbibisi benih yang terdiri atas tiga fase yaitu: penyerapan air secara cepat, ditandai peningkatan kadar air yang signifikan (fase 1); laju imbibisi mulai stagnan dan terjadi

peningkatan kadar air walaupun sedikit jumlahnya (fase 2/ lag period); terjadi peningkatan kadar air dan munculnya radikula (fase 3).

Percobaan 1 yang meliputi pengamatan aktivasi metabolisme, pengamatan struktur internal benih dan RE menghasilkan beberapa informasi yaitu: periode perendaman 12 s.d. 36 jam merupakan bagian dari lag period yang ditandai mulai adanya penyerapan air yang mendekati stagnan, pada jam ke-36 imbibisi struktur internal benih sudah semakin membesar dan radikula sudah mendekati ujung testa, dan lag period berakhir sekitar 42 jam setelah imbibisi, yang ditandai pemunculan radikula walaupun dalam jumlah yang sedikit. Berdasarkan hasil tersebut, waktu uji tetrazolium yang dipilih 36 jam. Waktu tersebut berada pada akhir lag period yang diharapkan kondisi jaringan benih sedang aktif melakukan metabolisme yang maksimal atau menyeluruh, namun pemunculan radikula belum terjadi. Jaringan benih yang sudah aktif melakukan metabolisme akan menghasilkan pewarnaan yang optimal.

Tahapan uji tetrazolium yaitu: (1) pre-treatment atau persiapan benih (perendaman dan skarifikasi), (2) proses pewarnaan dengan perendaman larutan tetrazolium 1%, dan (3) evaluasi pola pewarnaan (ISTA 2016). Berdasarkan hasil percobaan 1 waktu uji





tetrazolium ditetapkan pada jam ke-36, sementara pada tahapan ke-2 uji tetrazolium masih membutuhkan waktu selama 18 jam. Oleh karena itu, tahapan *pre-treatment* (perendaman benih dengan air) akan dilakukan selama 18 jam.

Percobaan 2: Penentuan Kriteria Benih Vigor Berdasarkan Pola Topografi Pewarnaan Tetrazolium




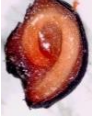

Pada percobaan 2 dilakukan uji tetrazolium (TZ) pada benih botani bawang

merah dengan mengamati struktur internal benih yang terwarnai satu persatu dengan menggunakan mikroskop stereo. Struktur internal yang diamati adalah: radikula, kotiledon, haustorium, dan endosperma. Benih-benih yang diamati dikelompokkan pada empat kriteria: pola vigor/ normal kuat (NK), normal lemah (NL), abnormal, dan mati. Pola-pola yang masuk dalam empat kriteria tersebut dirangkum dalam Tabel 1 s.d. 4.

Tabel 1. Pola pewarnaan tetrazolium kriteria normal kuat/ vigor

No	Gambar Pola Pewarnaan	Wilayah Struktur Internal Benih				No	Gambar Pola Pewarnaan	Wilayah Struktur Internal Benih			
		Radikula	Kotiledon	Haustorium	Endosperma			Radikula	Kotiledon	Haustorium	Endosperma
1		Merah merata	Merah merata	Merah merata	Merah merata	3		Merah cerah	Merah cerah	Merah	Merah
2		Merah merata	Merah cerah	Merah	Merah muda merata	4		Merah cerah	Merah cerah	Merah cerah	Merah Cerah

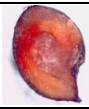
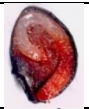

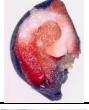



Tabel 2. Pola pewarnaan tetrazolium kriteria normal lemah

No	Gambar Pola Pewarnaan	Wilayah Struktur Internal Benih				No	Gambar Pola Pewarnaan	Wilayah Struktur Internal Benih			
		Radikula	Kotiledon	Haustorium	Endosperma			Radikula	Kotiledon	Haustorium	Endosperma
1		Merah muda	Merah muda	Merah muda	Merah	4		Merah cerah	Merah muda	Merah muda	Merah muda
2		Merah muda	Merah muda	Merah muda	Merah muda	5		Merah muda	Merah muda	Merah cerah	Merah
3		Merah	Merah dengan bercak sedikit merah tua	Merah	Merah bercak putih						

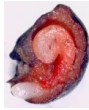

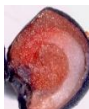
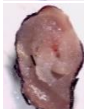
Batasan yang digunakan dalam kriteria pola benih pola NK/ vigor adalah seluruh area terwarnai secara merata dengan warna merah sampai merah cerah, struktur embrio dan endosperma turgid/kokoh tanpa lendir dan tidak lunak (Tabel 1). Pola NL – seluruh area terwarnai > 50%, area yang terwarnai berwarna merah, merah cerah, merah muda secara merata, struktur embrio turgid, embrio berwarna merah dengan sedikit bercak merah tua, atau sedikit nekrosis, bercak hitam

cendawan (Tabel 2). Menurut ISTA (2003) seluruh struktur internal meliputi poros embrio dan endosperma terwarnai dengan tetrazolium pada benih *Allium spp.* dimasukkan dalam kategori *viable*. Batas yang diperbolehkan hanya bagian sedikit dalam bentuk nekrosis pada bagian endosperma tetapi tidak pada bagian penghubung tempat embrio menempel dengan endosperma.

Tabel 3. Pola pewarnaan tetrazolium kriteria abnormal

No	Gambar Pola Pewarnaan	Wilayah Struktur Internal Benih				No	Gambar Pola Pewarnaan	Wilayah Struktur Internal Benih			
		Radikula	Kotiledon	Haustorium	Endosperma			Radikula	Kotiledon	Haustorium	Endosperma
1		Merah muda	Merah muda, bercak merah tua (warna tidak merata)	Merah muda	Merah muda	5		Merah	Putih	< 50% Merah	Merah
2		Merah muda pucat	Merah muda	Merah muda	Merah muda	6		Merah tua	Putih	Putih	Merah muda
3		Merah cerah	Merah cerah	Merah cerah	<50% merah	7		Merah tua	Merah Tua	Merah Tua	Merah Tua
4		Merah	Putih	Putih	Merah						

Tabel 4. Pola pewarnaan tetrazolium kriteria mati

No	Gambar Pola Pewarnaan	Wilayah Struktur Internal Benih				No	Gambar Pola Pewarnaan	Wilayah Struktur Internal Benih			
		Radikula	Kotiledon	Haustorium	Endosperma			Radikula	Kotiledon	Haustorium	Endosperma
1		Putih	Putih dengan <50% merah muda	Putih	Merah	3		Putih dengan bercak merah	Putih	Putih	
2		Putih	<50% merah	Merah	Merah	4		Merah muda pucat	Putih	Putih	

Batasan kriteria pola abnormal yaitu area yang terwarnai <50%, area yang terwarnai berwarna merah muda, merah tua, merah muda yang pucat, pada bagian kotiledon tidak terwarnai atau terwarnai <50%, terdapat lendir atau jaringan lunak yang bersifat minor tidak pada bagian area radikula dan haustorium (Tabel 3). Pola mati area yang terwarnai kurang dari 50%, warna merah muda pucat dan putih, struktur benih tidak turgid, lunak mudah hancur, warna tidak merata atau seluruhnya tidak terwarnai, endosperma atau embrio yang seluruhnya tidak terwarnai (Tabel 4). Pada jaringan yang mati tidak terjadi proses reduksi garam tetrazolium sehingga tidak terbentuk endapan formazan yang berwarna merah. Jaringan yang tampak akan tetap berwarna putih (Franca-Neto dan Krzyzanowski, 2019).

Kriteria-kriteria kelompok pola pewarnaan yang telah ditetapkan diharapkan menggambarkan parameter vigor maupun viabilitas. Kelompok pola normal kuat

menggambarkan vigor, penjumlahan pola normal kuat dan lemah menggambarkan viabilitas potensial. Parameter vigor dengan pendekatan fisiologis digambarkan pada tolok ukur IV, K_{CT}, dan BKKN, sedangkan parameter viabilitas potensial digambarkan oleh tolok ukur DB dan PTM.

Tabel 5 menunjukkan nilai vigor dan viabilitas potensial dari pendekatan fisiologis dan biokimiawi (pola pewarnaan TZ). Empat lot benih botani bawang merah memiliki tingkat vigor dan viabilitas yang berbeda nyata. Lot T1 dan T2 memiliki nilai vigor dan viabilitas tertinggi secara nyata dibandingkan lot T3 dan T4. Tolok ukur IV dan BKKN dapat membedakan tiga tingkat vigor benih, sementara tolok ukur DB dan PTM hanya dapat membedakan dua tingkat viabilitas. Pada pengujian pendekatan fisiologis ini tolok ukur IV dan BKKN merupakan tolok ukur yang paling sensitif dibandingkan tiga tolok ukur lainnya. Hal ini sesuai dengan pernyataan

Marcos-Filho (2015) bahwa uji vigor mampu menyediakan informasi mutu fisiologis lot-lot benih yang lebih sensitif dibandingkan uji perkecambahan.

Pada tolok ukur IV yang didasarkan pola NK hasil pewarnaan TZ lot benih, nilai IV dari lot T4 tidak berbeda nyata dengan T3. Akan tetapi nilai IV T4 tetap lebih rendah dibandingkan T3, sama halnya pada IV tolok ukur fisiologis. Pada nilai DB yang didasarkan pada pewarnaan TZ menghasikan tiga tingkat lot. Nilai DB T3 sebesar 72.50% yang berbeda nyata dengan T4 sebesar 61.75%, sementara pada uji fisiologis nilai DB T3 sebesar 65%. Nilai DB yang didasarkan pola NK dan NL cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan nilai uji fisiologis.

Pada Tabel 6 menunjukkan data persamaan regresi dan korelasi antara uji

fisiologis dan uji tetrazolium berdasarkan persentase pola kriteria normal kuat (NK) dan persentase N yaitu jumlah dari pola kriteria NK dan NL. Sementara tolok ukur PTM dikorelasikan dengan pola G yaitu persentase jumlah pola NK, NL, dan abnormal.

Hasil analisis pada Tabel 6 menunjukkan adanya hubungan positif antara uji fisiologi dengan uji tetrazolium. Pola NK memiliki nilai koefisien korelasi (r) yang lebih tinggi dibandingkan pola N. Nilai korelasi NK dengan nilai dari tolok ukur IV (r = 0.882), KCT (r = 0.875), BKKN-h6 (r = 0.899), DB (r = 0.806) dan pada uji fisiologis. Hal ini menunjukkan bahwa pola pewarnaan kriteria NK pada uji tetrazolium dapat digunakan dapat mengestimasi vigor dan viabilitas potensial benih bawang merah.

Tabel 5. Nilai parameter viabilitas dan vigor pendekatan fisiologis dengan hasil pola pewarnaan tetrazolium pada empat lot benih varietas Tuk-tuk

No	Lot	Tolok Ukur Fisiologis					Pola Pewarnaan TZ		
		IV (%)	K _{CT} (%/etmal)	BKKN-h6 (g)	DB (%)	PTM (%)	IV (NK)	DB (N)	PTM (G)
1	T1	81.25 a	17.173 a	0.1068 a	85.00 a	90.25 a	74.75 a	87.25 a	95.75 a
2	T2	79.00 a	17.058 a	0.0807 b	83.25 a	89.50 a	72.25 a	83.00 a	94.75 a
3	T3	49.25 b	10.276 b	0.0399 c	65.00 b	79.00 b	50.00 b	72.50 b	84.50 b
4	T4	38.00 c	10.161 b	0.0244 d	60.00 b	76.25 b	41.50 b	61.75 c	80.00 b
	KK (%)	6.72	5.83	8.91	5.58	3.99	11.26	7.16	3.63

Keterangan: angka-angka pada kolom yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji DMRT pada taraf 5%, IV= indeks vigor, KCT= kecepatan tumbuh, BKKN-h6= berat kering kecambah normal hari ke-6, DB= daya berkecambah, PTM= potensi tumbuh maksimum, NK= normal kuat, N= jumlah NK dan NL, G= jumlah NK, NL dan abnormal, dan KK= koefisien keragaman. Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan nilai tidak berbeda nyata pada uji DMRT taraf $\alpha = 5\%$

Tabel 6. Nilai persamaan regresi parameter pengujian fisiologis di laboratorium dengan pola pewarnaan vigor

Parameter vigor/ viabilitas	Y=ax+b	R	R ²	P value
IV (%)	IV = -3.316+1.093NK	0.882	0.779	<0.0001
IV (%)	IV = -52.694+1.505N	0.866	0.750	<0.0001
K _{CT} (% etmal ⁻¹)	K _{CT} = 1.723+0.2NK	0.875	0.766	<0.0001
K _{CT} (% etmal ⁻¹)	K _{CT} = -6.259+ 0.262N	0.826	0.682	<0.0001
BKKN-6h (g)	BKKN-h6 = -0.0521+0.00193NK	0.899	0.808	<0.0001
BKKN-6h (g)	BKKN-h6 = -0.1319+0.00256N	0.850	0.723	<0.0001
DB (%)	DB = 14.491+0.7700N	0.734	0.539	0.0012
DB (%)	DB = 37.234+0.605NK	0.806	0.650	0.0002
PTM (%)	PTM = 12.897+0.798G	0.846	0.715	<0.0001

Keterangan : r = koefisien korelasi, R² = koefisien determinasi IV= indeks vigor, KCT= kecepatan tumbuh, BKKN-h6= berat kering kecambah normal hari ke-6, DB= daya berkecambah, PTM= potensi tumbuh maksimum, NK= normal kuat, N= jumlah NK dan NL, G= jumlah NK, NL dan abnormal.

Pola N merupakan persentase dari jumlah kecambah NK dan NL. Pola kecambah NL diprediksi menghasilkan kecambah dengan daya kemampuan yang cukup untuk tumbuh menjadi tanaman normal akan tetapi tidak vigor. Hal ini diduga adanya variasi yang tinggi pada evaluasi pola NL dengan abnormal karena keduanya memiliki sifat intermedit yang berdekatan. Hal ini dapat terjadi kekeliruan evaluasi dalam menentukan pola normal lemah atau abnormal. Oleh karena itu mengakibatkan korelasi pola N dengan nilai daya berkecambah nilai korelasinya lebih rendah dibandingkan dengan korelasi antara parameter vigor maupun viabilitas. Nilai koefisien korelasi antara parameter vigor dengan NK lebih tinggi dibandingkan dengan nilai korelasi antara viabilitas dengan NK.

Penelitian sebelumnya menyebutkan uji tetrazolium dapat dijadikan sebagai uji viabilitas maupun uji vigor. Pada penelitian Flores *et al.* (2011) terdapat empat pola pewarnaan benih yang viable dan dua non-viable benih walnut hitam dan koefisien korelasi yang tinggi antara hasil uji TZ dengan pengujian perkecambahan ($r = 0.98$). Pada penelitian Santos *et al.* (2007) uji tetrazolium dapat mengestimasi viabilitas maupun vigor benih tomat. Pada penelitian Dina (2007) diperoleh tiga pola topografi dapat mengestimasi vigor benih kedelai di laboratorium dan pertumbuhan di lapangan. Tiga pola tersebut juga memiliki korelasi yang tinggi terhadap pertumbuhan maupun produksi

KESIMPULAN

Metode *pre-treatment* dalam uji tetrazolium telah didapatkan perendaman benih dengan air selama 18 jam, dilanjutkan pewarnaan dengan larutan tetrazolium 1 % selama 18 jam. Pola pewarnaan tetrazolium benih botani bawang merah yang diperoleh yaitu: kecambah normal kuat yang berjumlah 4 pola, kecambah normal lemah sejumlah 5 pola, kecambah abnormal sejumlah 7 pola, dan benih mati sejumlah 4 pola. Pola normal kuat memiliki nilai koefisien korelasi (r) yang tinggi dengan parameter uji fisiologis di laboratorium yaitu: indeks vigor ($r = 0.882$), berat kering kecambah normal hari ke-6 ($r = 0.899$), dan kecepatan tumbuh ($r = 0.875$). Pola pewarnaan kriteria normal kuat pada uji

tetrazolium dapat digunakan sebagai parameter vigor benih bawang merah.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penyuluhan dan Pengembangan Sumber Daya Manusia Pertanian, Kementerian Pertanian atas dana yang diberikan untuk penelitian ini, Balai Besar Pengembangan Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura atas fasilitas yang disediakan, dan berbagai pihak yang terlibat dalam mendukung kelancaran menjalankan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M. 2017. Pola pewarnaan pada uji tetrazolium untuk deteksi vigor benih bawang merah (*Allium ascolanicum* L.). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 45 hal.
- Bradford, K.J. 1990. A water relations analysis of seed germination rates. *Plant Physiol.* 94: 840-849. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.840>
- Copeland, L.O., M.B. McDonald. 2001. *Principles of Seed Science and Technology*. Fourth Edition. Kluwer Academic Publishers, Massachuset.
- Dias, D.C.F.D.S., M.C. Bhering, D. Tokuhisa, P.C. Hilst. 2006. Electrical conductivity test to evaluate onion seed vigor. *Revista Brasileira de Sementes*. 28 (1): 154-162. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222006000100022>
- Dina, E. Widajati, B. Wirawan, S. Ilyas. 2007. Pola topografi pewarnaan tetrazolium sebagai tolok ukur viabilitas dan vigor benih kedelai (*Glycine max* L. Merr.) untuk pendugaan pertumbuhan tanaman di lapangan. *Bul. Agron.* 35 (2): 88-95.

- Elias, S.G., L.O. Copeland, M.B. McDonald, R.Z. Baalbaki. 2012. Seed Testing Principles and Practices. Michigan State University Press, East Lansing, Michigan.
- Flores, P.C., D. Poggi, S.M. Garcia, N.F. Gariglio. 2011. Topographic tetrazolium testing of black walnut (*Juglans nigra* L.) seeds. *Seed Sci. & Technol.* 39: 230-235. <https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.1.23>
- Franca-Neto, J.B., F.C. Krzyzanowski. 2019. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science.* 41 (3): 359-366. Doi: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n3223104>
- [ISTA] International Seed Testing Association. 2003. ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing Volume 1. Leist N, Kramer S, Jonitz A (eds.). International Seed Testing Association, Zurich.
- [ISTA] International Seed Testing Association. 2016. International Rules of Seed Testing. International Seed Testing Association, Zurich.
- Madyasari, I., C. Budiman, Syamsuddin, D. Manohara, S. Ilyas. 2017. Efektivitas seed coating dan biopriming dengan rizobakteri dalam mempertahankan viabilitas benih cabai dan rizobakteri selama penyimpanan. *J. Hort. Indonesia* 8(3): 192-202. Doi: <https://doi.org/10.29244/jhi.8.3.192-202>
- Marcos-Filho, J. 2015. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola.* 72 (4): 363-374. Doi: <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0007>
- Matthews, S., A. Powell. 2011. Towards automated single counts of radicle emergence to predict seed and seedling vigour. *Seed Testing International.* 142: 44-48.
- Prayudi, B., R. Pangestuti, A.C. Kusumasari. 2015. Produksi umbi mini bawang merah asal true shallot seed. *Dalam* I. Djatnika, M.J.A. Syah, D. Widiastoety, M.P. Yufdy, S. Prabawati, S. Pratikno, O. Lutfiyah (eds.). Inovasi Hortikultura Pengungkit Peningkatan Pendapatan Rakyat. IAARD Press, Jakarta.
- Rodo, A.B., J. Marcos-Filho. 2003. Accelerated aging and controlled deterioration for the determination of the physiological potential of onion seeds. *Scientia Agricola* 60 (3): 465-469. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162003000300008>
- Sadjad, S., E. Muniarti, S. Ilyas. 1999. Parameter Pengujian Vigor Benih dari Komparatif ke Simulatif. Grasindo, Jakarta.
- Santos, M.A.O., A.D.L.C. Novembre, J. Marcos-Filho. 2007. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. *Seed Sci. & Technol.* 35: 213-223. Doi: <https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.1.19>
- Statistika tanaman sayuran dan buah-buahan semusim Indonesia. 2018. <https://www.bps.go.id/publication/2019/10/07/9c5dede09c805bc38302ea1c/statistik-tanaman-sayuran-dan-buah---buah-semusim-indonesia-2018.html>. [4 Mei 2019].