

PENGAJIAN VIABILITAS BENIH DENGAN TETRAZOLIUM TEST PADA JAGUNG DAN KEDELAI

Renan Subantoro, Rossi Prabowo

Fakultas Pertanian Universitas Wahid Hasyim Semarang

ABSTRACT

Tetrazolium test is a test of dehydrogenase enzyme activity in seed tissue, so that the tissue is known to live or die in the embryo. The basic principle of this test is used chemical reduction of tetrazolium chloride 3,3,5 Triphenil initially colorless be red tissue. Staining intensity indicates the viability of the tissue. Tissue on seed dies, certainly not able to germinate seeds or germinated abnormally. This experiment using corn seed (monocots) and soybean seed (dicots). Testing seed viability quick and topography using tetrazolium salt solution and to control seed viability testing with germinated in germination plate. Both of these tests using a t-test. The results of the study are: corn seed viability testing quick by using the tetrazolium test can be conducted show significantly different results with the results of direct germination test (control), environmental factors on the test field with sand media should be controlled so that the optimum for germination, and seed are still viable indicated by a color change in the embryo and endosperm become red. .

Key Words : *Tetrazolium, Viability, Enzim Dehidrogenase, Seed*

PENDAHULUAN

Viabilitas benih dipakai untuk mengetahui kemampuan tumbuh normal dalam kondisi optimal dan sub optimal. Vigor benih merupakan kemampuan benih untuk tumbuh normal pada keadaan lingkungan yang sub optimal (Sutopo, 1984). Vigor dipisahkan antara vigor genetik dan vigor fisiologi. Vigor fisiologi dapat dilihat antara lain indikasi tumbuh akar dari plumula atau koleoptilnya, ketahanan terhadap serangan penyakit dan warna kotiledon dalam efeknya terhadap tetrazolium test (Kartasapoetra, 1986). Pengujian viabilitas benih yang sering dilakukan adalah dengan mencambahkan benih kemudian dihitung daya kecambahnya. Pengujian ini berlangsung lama sehingga apabila ada kebutuhan akan benih yang mendesak dengan pengujian secara cepat dengan menggunakan uji tetrazolium (Sutopo, 1984). Tetrazolium test adalah metode pewarnaan topografis yang digunakan untuk menguji viabilitas benih secara cepat dengan menggunakan bahan kimia garam tetrazolium yang dapat memberikan warna merah pada sel dan sifatnya yang tidak beracun (Sutakaria, 1974).

Tetrazolium test merupakan uji aktivitas enzim dehidrogenase pada jaringan biji, sehingga diketahui jaringan tersebut hidup atau mati pada embrio. Prinsip dasar uji ini adalah reduksi kimia yang dipakai 3,3,5 Triphenil tetrazolium chloride yang semula tidak berwarna menjadi formasi yang

berwarna merah Intensitas pewarnaan jaringan menunjukkan viabilitas jaringan tersebut. Tempat/jaringan tertentu pada biji ternyata mati, dipastikan biji tersebut tidak mampu berkecambah atau berkecambah tidak normal. Pengujian viabilitas benih dengan menggunakan metode pengecatan tetrazolium merupakan suatu metode pengujian untuk mengetahui viabilitas benih secara cepat, karena benih-benih yang diuji tidak perlu dikecambahkan yang akan memerlukan waktu lebih lama, sehingga metode pengujian ini dapat juga disebut dengan *Quick test* (Vanilla *et.al.*, 2000). Prinsip kerja uji ini adalah membedakan antara benih yang hidup dari yang telah mati didasarkan atas kecepatan relatif respirasinya dalam keadaan basah. Meskipun selama respirasi ini banyak enzim yang aktif, tetapi tetrazolium test ini menggunakan aktivitas enzim dehidrogenase sebagai indeks bagi kecepatan respirasi dan viabilitas ion hidrogen yang mengoksidasi garam tetrazolium yang tidak berwarna, berubah berdasarkan pola pengecatan topografis embrio dan intensitasnya (Sudikno, 1984).

Skema reaksi yang terjadi pada uji Tetrazolium Test sebagai berikut :

Thompson *et.al.* (1993) berpendapat bahwa tetrazolium test tidak dapat mendeteksi keabnormalitasan benih, tetapi hanya dapat mendeteksi benih yang hidup dan benih yang mati. Hal ini disebabkan banyak faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan benih sehingga pengujian benih yang berkecambah tidak dapat dideteksi oleh tetrazolium test, misalnya adanya masa dormansi, penyakit dan kerusakan bahan kimia yang digunakan.

Menurut Sutopo (2004), bahwa kelebihan dari tetrazolium test adalah :

1. Tetrazolium test akan memberikan keterangan lebih cepat (1-2 hari) dari pada uji perkecambahan secara langsung.
2. Membantu perkecambahan untuk benih-benih yang dorman dan lambat berkecambah.
3. Untuk kelompok benih yang gagal berkecambah atau mungkin berkecambah lebih lambat dari biasanya disebabkan oleh tipe dormansi *after ripening* sehingga untuk mengetahui viabilitasnya dengan cepat dilakukan dengan tetrazolium test.

Kelemahan dari tetrazolium test adalah :

1. Efek phytotoksik dari fungisida, insektisida atau fumigasi dengan metil bromide yang telah diperlakukan pada benih tidak dapat diketahui dengan tetrazolium test.
2. Tidak selalu dapat memberi keterangan tentang kerusakan pada benih yang diakibatkan oleh proses pengeringan.
3. Memerlukan lebih banyak ketrampilan dan keputusan serta pembesaran untuk dapat mempelajari dengan teliti pola lokasi daerah yang berwarna maupun yang tidak berwarna.

Petunjuk teknis pengujian mutu fisik dan fisiologi benih menjelaskan bahwa pengujian benih mencakup pengujian mutu fisikfisiologi benih. Petunjuk ini menjelaskan bagaimana mempersiapkan contoh yang mewakili lot benih untuk keperluan pengujian, dan bagaimana melakukan pengujian benih, yaitu :

- Analisis kemurnian
- Penentuan berat 1000 butir benih

- Penentuan kadar air
- Uji perkecambahan
- Uji belah
- Uji tetrazolium

Tujuan penelitian :

1. Mengetahui cara menguji viabilitas benih kedelai dan jagung secara cepat dengan tetrazolium test.
2. Mengetahui faktor lingkungan yang mempengaruhi tetrazolium test pada benih kedelai dan jagung.
3. Mengetahui benih kedelai dan jagung yang viabel (hidup dan matinya benih) secara cepat.

Bahan dan Metode

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Wahid Hasyim Semarang, bulan Juli 2013.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam percobaan meliputi benih jagung, kedelai, garam tetrazolium, aquades, kertas karbon. Sedangkan alat yang digunakan meliputi bak perkecambahan, gelas ukur, petridish, dan timbangan.

C. Metode Percobaan

Percobaan menggunakan benih jagung (monokotil) dan benih kedelai (dikotil). Pengujian viabilitas benih secara cepat dan topografi ini menggunakan larutan garam tetrazolium dan untuk control dilakukan pengujian viabilitas benih dengan dikecambahkan dalam bak perkecambahan. Kedua pengujian ini menggunakan t-test.

D. Pelaksanaan

- 1) Menyiapkan benih jagung dan kedelai kemudian merendam dalam air selama 10 jam.
- 2) Membuat larutan tetrazolium 0,1% dan 1%.
- 3) Perendaman benih monokotil dan dikotil dalam larutan tetrazolium yang dapat dibedakan yaitu :
 - a) Benih monokotil
 - Menyiapkan benih yang sudah direndam air selama 10 jam, belah benih secara longitudinal dan belahan diusahakan tidak pisah, sehingga embrio terlihat jelas.
 - Merendam benih jagung yang telah dibelah sebanyak 25 benih dalam larutan tetrazolium 0,1% selama 1-2 jam dalam petridish, diulang 4 kali.
 - Petridish ditutup dengan kertas karbon agar tidak terkena sinar.
 - Sebagai kontrol, mengecambahkan benih jagung sebanyak 25 benih diulang 4 kali.
 - b) Benih dikotil
 - Menyiapkan benih kedelai yang sudah direndam air selama 10 jam, mengupas kulitnya.

- Benih kedelai sebanyak 25 direndam dalam larutan tetrazolium 1% dalam petridish selama 1-2 jam, diulang 4 kali.
 - Petridish ditutup dengan kertas karbon agar tidak terkena sinar.
 - Sebagai control, benih kedelai sebanyak 25 benih dikecambahkan dalam bak perkecambahan diulang 4 kali.
- 4) Pengamatan
- a) Pengujian tetrazolium
- Pengamatan viabilitas benih berdasarkan pola pewarnaan merah di daerah embrio. Amati pada embrio benih jagung maupun benih kedelai, hitung jumlah benih yang embrionya berwarna merah secara penuh, dapat menggunakan kaca pembesar. Menggunakan buku petunjuk tetrazolium untuk melihat benih yang mampu berkecambah (germinable) berdasarkan pola pewarnaan merah di daerah embrio. Hitung persentase benih yang mampu berkecambah berdasarkan pola pewarnaan merah.
- b) Pengujian perkecambahan
- Mengamati benih yang dikecambahkan dalam bak perkecambahan setiap hari dan hitung jumlah benih secara kumulatif selama 7 hari. Hitung persentase perkecambahannya. Membandingkan persentase perkecambahan benih dengan persentase benih berdasarkan pola pewarnaan merah pada tetrazolium dengan t-test.

Hasil dan Pembahasan

A. Uji Tetrazolium Benih Jagung

Pengujian vigor (vigor test) dengan pengecatan tetrazolium biji jagung menunjukkan hasil yang secara statistik sama dengan hasil pada uji perkecambahan standart (Tabel 1).

Tabel 1. Uji Viabilitas Benih Jagung Dengan Tetrazolium Test

Ulangan	Jumlah Benih Berkecambah		Persentase Perkecambahan (%)	
	Tetrazolium	Kontrol	Tetrazolium	Kontrol
1	25	13	100	52
2	24	14	96	56
3	22	16	88	64
4	22	24	88	96
Jumlah	93,00	67,00	372,00	268,00
rata-rata	23,25	16,75	93,00	67,00
t_{α}	2,45		2,45	
t hit.	2,49		2,49	

Keterangan: Berbeda nyata

Keterangan: Berbeda nyata

Keterangan : t hitung $> t_{\alpha}$ 0,05 artinya antara pengujian TZ berbeda nyata dengan kontrol

Pada tabel 1. menunjukkan hasil pengujian dengan t-test pada jumlah benih berkecambah dan persentase perkecambahan memberikan perbedaan yang

nyata pada kedua perlakuan. Tetrazolium test pada uji viabilitas benih jagung menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol.

Hasil pengujian tetrazolium menunjukkan bahwa pada biji jagung yang masih sehat, kotiledon dan embrionya berwarna merah, dan biji ini memberikan persentase perkecambahan yang tinggi dan benih tumbuh dengan baik dan cepat. Sedangkan sebagian biji telah mengalami pembusukan saat uji tetrazolium yang ditandai adanya kotiledon dan endosperm yang berwarna merah kehitam-hitaman serta axis embrionya berwarna coklat kehitaman. Biji tersebut umumnya tidak bisa lagi berkecambah atau apabila masih mampu berkecambah, pertumbuhan bibitnya lambat dan abnormal, dan bahkan pertumbuhan bibit yang demikian sering berakhir dengan kematian.

Pada uji tetrazolium, garam tetrazolium (2,4,5 triphenyl tetrazolium chloride) sebagai suatu "oxidation reduction indicator" oleh aksi enzim dehidrogenase dirubah dari bentuk oksidasi, tak berwarna, terlarut (soluble) menjadi bentuk reduksi berwarna merah, tak terlarut (insoluble) yang disebut formazan (Isely, 1985). Enzim dehidrogenase ini terdapat dalam sel hidup atau dengan kata lain aktivitasnya semakin berkurang apabila sel semakin menuju kematian atau membusuk.

Tetrazolium dalam bentuk oksidasi, karena sifatnya terlarut maka ia mudah masuk dan keluar sel. Tetrazolium dalam bentuk tereduksi, karena sifatnya tidak terlarut, ia tetap tinggal di dalam sel yang memberikan warna merah pada sel. Akan tetapi pada sel yang sudah mati atau busuk (deterioration) dimana aktivitas enzim pada sel tersebut tidak ada lagi atau berkurang, maka tetrazolium (dalam bentuk oksidasi, terlarut, tak berwarna) yang masuk ke dalam sel itu tidak berwarna merah atau berwarna namun sedikit.

Thompson *et.al.* (1993) berpendapat bahwa tetrazolium test tidak dapat mendeteksi keabnormalan benih, tetapi hanya dapat mendeteksi benih yang hidup dan benih yang mati. Hal ini disebabkan banyak faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan benih sehingga pengujian benih yang berkecambah tidak dapat dideteksi oleh tetrazolium test, misalnya adanya masa dormansi, penyakit dan kerusakan bahan kimia yang digunakan.

Sebagai pembanding, juga dilakukan uji vigor perkecambahan, dimana mengecambahkan biji yang sama dalam bak perkecambahan dengan menggunakan media pasir. Hasil uji lapangan ini menunjukkan hasil yang tidak signifikan dengan hasil uji tetrazolium. Ini menunjukkan bahwa uji tetrazolium sebagai metode pengujian cepat vigor benih dapat dilakukan.

Pengujian viabilitas benih dengan menggunakan metode pengecatan tetrazolium merupakan suatu metode pengujian untuk mengetahui viabilitas benih secara cepat, karena benih-benih yang diuji tidak perlu dikecambahkan yang akan memerlukan waktu lebih lama, sehingga metode pengujian ini dapat juga disebut dengan *Quick test* (Vanilla *et.al.*, 2000).

Pada pengujian cepat vigor biji kedelai, hasil yang ditunjukkan pada pengujian cepat tetrazolium memberikan perbedaan yang secara signifikan dengan uji kecamah standart. (Tabel 2).

B. Uji Tetrazolium Benih Kedelai

Tabel 2. Jumlah kecambah dan persentase perkecambahan benih kedelai pada pengujian tetrazolium.

Ulangan	Jumlah Benih Berkecambah		Persentase Perkecambahan (%)	
	Tetrazolium	Kontrol	Tetrazolium	Kontrol
1	18	19	72	76
2	22	12	88	48
3	22	22	88	88
4	20	17	80	68
Jumlah	82,00	70,00	328,00	280,00
rata-rata	20,50	17,50	82,00	70,00
t_α	2,45		2,45	
t hit.	1,29		1,29	
	Keterangan: Berbeda tidak nyata		Keterangan: Berbeda tidak nyata	

Keterangan : t hitung < t_α 0,05 artinya antara pengujian TZ berbeda tidak nyata dengan kontrol

Hasil pengujian dengan t test menunjukkan bahwa jumlah benih berkecambah dan persentase perkecambahan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada kedua perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian viabilitas benih dengan metode tetrazolium test cukup tepat dan akurat serta cepat untuk uji viabilitas benih. Tetrazolium test didasarkan pada warna merah yang terbentuk pada jaringan benih terutama pada bagian embrio benih jagung dan benih kedelai. Benih-benih yang mempunyai viabilitas yang masih baik ditunjukkan dengan warna merah apabila direndam dalam larutan garam tetrazolium.

Hasil pengecatan tetrazolium ditunjukkan bahwa pada biji kedelai terdapat sebagian biji yang masih sehat, kotiledon dan embrionya berwarna merah, dan biji ini mempunyai nilai persentase perkecambahan yang tinggi serta benih tumbuh dengan baik dan kecepatannya relatif tinggi. Sedangkan sebagian biji telah mengalami pembusukan yang dalam uji tetrazolium ditandai dengan kotiledon dan endosperm yang berwarna merah kehitam-hitaman serta axis embrionya berwarna coklat kehitaman. Biji tersebut pada umumnya tidak mampu berkecambah atau apabila masih mampu berkecambah, pertumbuhan bibitnya lambat dan abnormal, dan bahkan pertumbuhan bibit yang demikian sering berakhir dengan kematian.

Pengujian dengan tetrazolium, garam tetrazolium (2,4,5 triphenyl tetrazolium chloride) sebagai suatu "oxidation reduction indicator" oleh aksi enzim dehydrogenase diubah dari bentuk oksidasi, tak berwarna, terlarut (soluble) menjadi bentuk reduksi berwarna merah, tak terlarut (insoluble) yang disebut formazan (Yudono, P. 1995). Enzim dehydrogenase ini terdapat dalam sel yang

hidup dimana aktivitasnya semakin menurun apabila sel semakin menuju kematian atau membusuk.

Tetrazolium dalam bentuk oksidasi, karena sifatnya terlarut maka ia mudah masuk dan keluar sel. Tetrazolium dalam bentuk tereduksi, karena sifatnya tidak terlarut, ia tetap tinggal di dalam sel yang memberikan warna merah pada sel. Akan tetapi pada sel yang sudah mati atau busuk (deterioration) dimana aktivitas enzim pada sel tersebut menurun, maka tetrazolium (dalam bentuk oksidasi, terlarut, tak berwarna) yang masuk ke dalam sel itu tidak berwarna merah atau berwarna namun sedikit.

Pengujian viabilitas benih dengan menggunakan metode pengecatan tetrazolium merupakan suatu metode pengujian untuk mengetahui viabilitas benih secara cepat, karena benih-benih yang diuji tidak perlu dikecambahkan yang akan memerlukan waktu lebih lama, sehingga metode pengujian ini dapat juga disebut dengan *Quick test* (Vanilla *et.al.*, 2000).

Uji vigor perkecambahan kedelai juga diberikan pada perlakuan kontrol, dimana mengecambahkan biji kedelai yang sama dalam bak perkecambahan dengan menggunakan media pasir. Hasil uji lapangan ini menunjukkan hasil yang tidak berbeda secara signifikan dengan hasil uji tetrazolium. Hal itu diduga adanya faktor lingkungan yang optimum mendukung uji lapangan perkecambahan benih kedelai dalam bak perkecambahan, sehingga menunjukkan hasil yang tidak berbeda dengan uji tetrazolium pada benih kedelai. Ini menunjukkan bahwa uji tetrazolium dapat digunakan sebagai metode pengujian cepat vigor benih. Faktor lingkungan pada pengujian benih dilapangan dengan menggunakan media pasir, dapat dikendalikan agar faktor lingkungan tersebut optimal bagi perkecambahan benih kedelai.

Thompson *et.al.* (1993) berpendapat bahwa tetrazolium test tidak dapat mendeteksi keabnormalitasan benih, tetapi hanya dapat mendeteksi benih yang hidup dan benih yang mati. Hal ini disebabkan banyak faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan benih sehingga pengujian benih yang berkecambah tidak dapat dideteksi oleh tetrazolium test, misalnya adanya masa dormansi, penyakit dan kerusakan bahan kimia yang digunakan.

KESIMPULAN

1. Pengujian viabilitas benih kedelai secara cepat dengan menggunakan uji tetrazolium dapat dilakukan menunjukkan hasil yang samadengan hasil pengujian perkecambahan secara langsung (kontrol). Sedangkan pengujian viabilitas benih jagung secara cepat dengan menggunakan uji tetrazolium dapat dilakukan menunjukkan hasil yang berbeda secara signifikan dengan hasil pengujian perkecambahan secara langsung (kontrol).
2. Faktor lingkungan pada pengujian dilapangan dengan media pasir (Topografi Test) harus dikendalikan sehingga optimal bagi perkecambahan.
3. Benih-benih yang masih viabel ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada embrio dan endosperm menjadi merah.

Daftar Pustaka

Sutakaria, J. 1974. *Penyakit Benih dan Pengujian Kesehatan Benih*. Proc. Kursus Singkat Pengujian Benih. IPB Bogor.

Sutopo, L. 2004. *Teknologi Benih*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

Gardner et al., 2008. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. UI Press. Jakarta.

Yudono, P, (1995). *Ilmu Biji*. Diktat Kuliah Fak. Pertanian UGM. Yogyakarta