

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Gedung Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dari Bulan November 2011 sampai dengan bulan April 2012.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain empat jenis tipe eksplan (kotiledon, hipokotil, *leaflet*, dan radikula) dari dua varietas kacang tanah nasional (Kancil dan Singa) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian Malang, bahan-bahan kimia sesuai dengan formula media MS (Murashige dan Skoog, 1962), aquades, pikloram 16 μ M, agar-agar, Natrium hipoklorit/Bayclin, Tween-20, spiritus, dan air steril.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas (botol kultur, beaker, labu takar, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, pipet, dan corong gelas), neraca analitik, pH meter, autoklaf, *laminar air flow cabinet* (LAFC), peralatan diseksi (pinset, spatula, pisau dan skalpel), plastik, karet, kompor gas, panci, sendok pengaduk, pembakar Bunsen, gunting, botol sprayer, ruang inkubasi dengan AC, dan rak kultur.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan perlakuan yang digunakan pada setiap varietas adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) tunggal dengan 4 perlakuan tipe eksplan (kotiledon, hipokotil, *leaflet*, radikula) dan 8 ulangan. Varietas yang digunakan adalah Kancil dan Singa.

Unit percobaan terdiri dari lima eksplan yang dikulturkan dalam satu botol dan diulang sebanyak delapan kali (total 40 eksplan per perlakuan). Dari data hasil pengamatan dianalisis dengan uji t pada taraf 5%.

$$S^2(\bar{A}-\bar{B}) = S \bar{A}^2 + S \bar{B}^2 = \frac{S A^2}{n_A} + \frac{S B^2}{n_B}$$

Keterangan =

$S A^2$ = Nilai tengah *leaflet*

$S B^2$ = Nilai tengah Kotiledon/Hipokotil/Radikula

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan seperti botol kultur, alat-alat diseksi (gunting, pisau, pinset, spatula), dan peralatan gelas lainnya dicuci bersih terlebih dahulu.

Kemudian peralatan tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf selama 30 menit pada tekanan 1,2 kg/cm² dengan suhu 121°C.

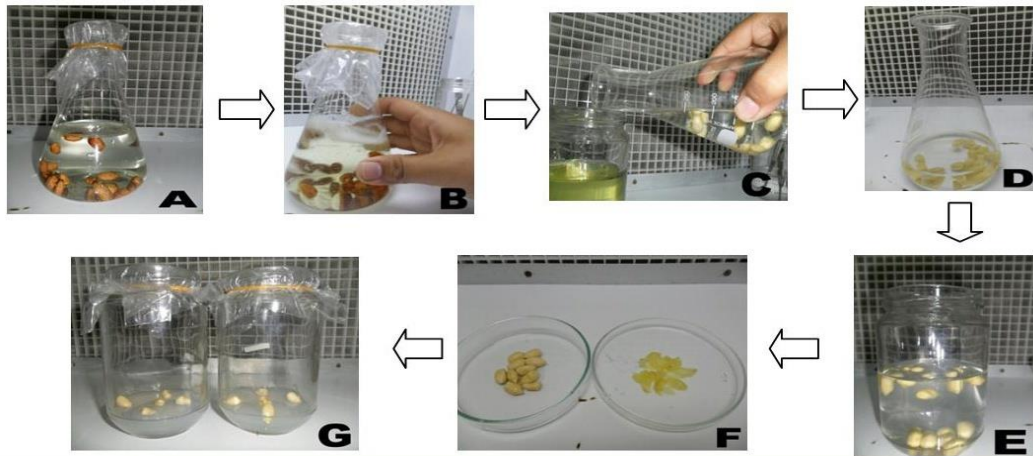
3.4.2 *Media Perlakuan*

Media yang digunakan dalam penelitian ini ada dua jenis, yaitu media pada tahap pengecambahan benih dan induksi embrio somatik. Media pengecambahan benih adalah media MS 0 (media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh).

Sedangkan media yang digunakan untuk induksi embrio somatik adalah media MS dengan penambahan pikloram 16 μM . Pada kedua media tersebut ditambahkan sukrosa 30 g/l dan agar-agar pematat 6 g/l. Sebelum disterilkan, pH media diatur sehingga mencapai 5,8.

3.4.3 *Sterilisasi dan Isolasi Eksplan (Bagian Benih)*

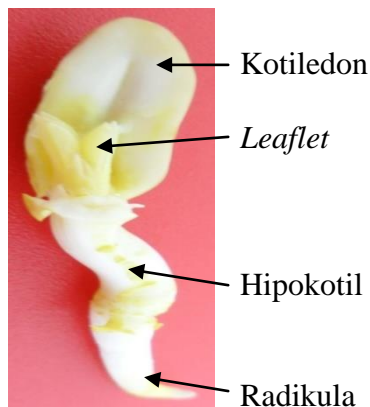
Tahapan sterilisasi sumber eksplan (Gambar 4) yaitu dengan merendam-kocok sumber eksplan (benih kacang tanah) di dalam larutan Bayclin 30% ditambah dengan 10 tetes detergen Tween-20 selama 20 menit atau sampai kulit benih memutih (Gambar 4A dan 4B). Kemudian dibilas dengan air steril minimal tiga kali hingga bersih dari larutan pemutih dan busa detergen (Gambar 4C, 4D, dan 4E). Kulit benih kemudian dikupas (Gambar 4F). Setelah kulit benih dikupas, benih dikecambahkan dalam media MS 0 selama 6 hari (Gambar 4G).



Gambar 4. Tahapan sterilisasi benih kacang tanah : (A) benih direndam dalam larutan Bayclin+Tween, (B) benih dikocok, (C) dibilas dengan air steril, (D) bilasan kedua, (E) bilasan ketiga, (F) kulit benih dikupas, (G) benih dikecambahkan dalam media MS0.

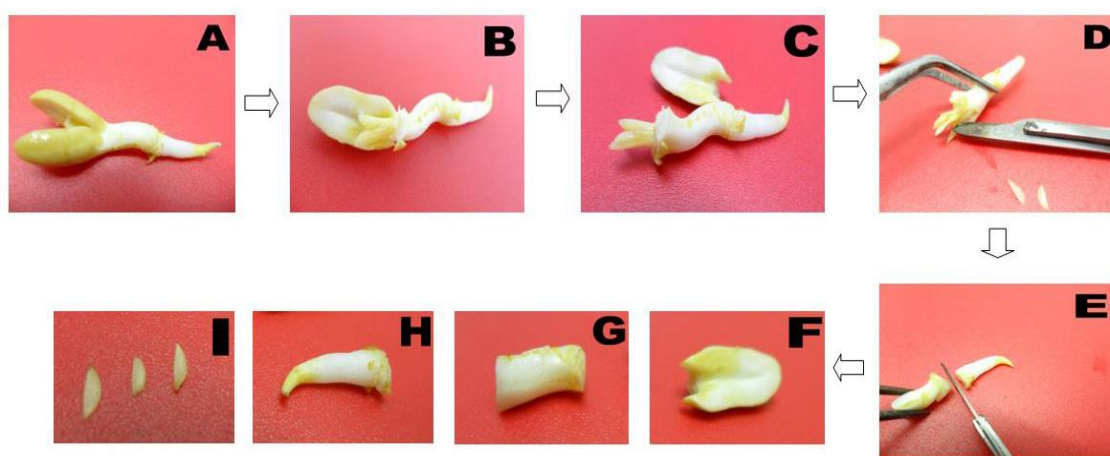
3.4.4 Penanaman dan Sub Kultur

Sumber eksplan yang telah disterilkan ditanam secara aseptik (di dalam *laminar air flow cabinet*) pada media pengecambahan (MS 0). Setelah berumur enam hari, benih sumber eksplan diisolasi, benih dibelah dan diambil empat bagian benihnya (Gambar 6) yaitu kotiledon (Gambar 6F), hipokotil (Gambar 6G), *leaflet* (Gambar 6I), dan radikula (Gambar 6H) untuk ditanam secara aseptik pada media induksi embrio somatik (MS+pikloram 16 μ M).



Gambar 5. Bagian-bagian sumber eksplan

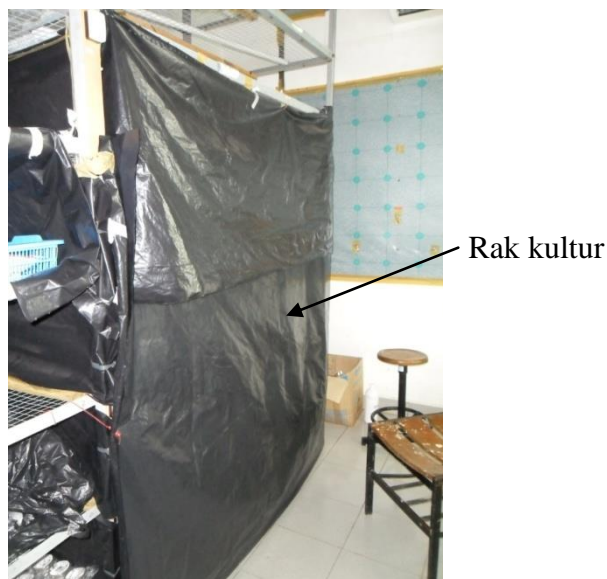
Dalam satu botol terdapat lima eksplan dari masing-masing perlakuan. Subkultur dilakukan setiap empat minggu. Subkultur juga dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow cabinet* setiap empat minggu sekali. Subkultur dilakukan dengan cara memindahkan semua eksplan pada masing-masing ulangan ke dalam media induksi yang baru. Hal ini bertujuan untuk mengganti media lama yang telah digunakan selama empat minggu dengan media yang baru, agar nutrisi tanaman tetap terpenuhi.



Gambar 6. Tahapan isolasi eksplan Kacang Tanah : (A) kecambah benih umur 6 hari, (B) kotiledon dibuka, (C) kotiledon dipisahkan dan diambil salah satu sebagai eksplan, (D) *leaflet* dipisahkan, (E) radikula dan hipokotil dipisahkan, (F) eksplan kotiledon, (G) eksplan hipokotil, (H) eksplan radikula, (I) eksplan *leaflet*.

3.4.5 Pemeliharaan Kultur

Semua kultur dipelihara di rak-rak kultur di dalam ruang kultur yang dikondisikan dengan suhu rata-rata 24°C. Selama periode induksi embrio somatik, kultur diinduksi dalam kondisi gelap selama 24 jam. Dalam penelitian ini, dilakukan penutupan rak kultur dengan plastik hitam (Gambar 7).



Gambar 7. Rak kultur dengan kondisi gelap dalam ruang inkubasi

Setiap hari kultur diamati untuk melihat apakah terjadi kontaminasi dan untuk mencegah tersebarnya kontaminasi pada eksplan lain dalam satu satuan percobaan, maupun satuan percobaan lainnya. Apabila terjadi kontaminasi pada salah satu sub eksplan namun tidak melebihi dua eksplan pada setiap satuan percobaan, maka dilakukan sub kultur dengan cara memindahkan eksplan yang tidak terkena kontaminasi ke dalam media induksi yang baru. Namun, bila kontaminasi terjadi lebih dari dua eksplan dalam satu satuan percobaan, maka ulangan tersebut dikeluarkan dari rak kultur dan dilakukan pemotongan ulangan.

Selain itu, lingkungan ruang kultur dijaga agar tetap bersih, untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Terjaganya ruang kultur agar tetap bersih sangat penting dalam penelitian kultur jaringan, karena dibutuhkan lingkungan yang steril dalam proses penyimpanan botol-botol eksplan di dalam ruang kultur.

3.5 Variabel yang diamati

Pengamatan pada eksplan dilakukan setiap empat minggu sekali selama 12 minggu setelah tanam (mst) pada media induksi. Embrio yang diamati adalah embrio primer dan sekunder. Variabel yang diamati adalah :

1. Morfologi embrio somatik yang terbentuk pada eksplan.

Pada variabel ini, dilakukan pengamatan secara visual terhadap bentuk morfologi embrio somatik yang terbentuk pada eksplan untuk masing-masing varietas kacang tanah.

2. Rata-rata jumlah embrio somatik yang terbentuk per eksplan.

Pengamatan rata-rata jumlah embrio somatik dilakukan dengan cara menghitung jumlah embrio somatik yang terbentuk pada eksplan, pada setiap satu satuan percobaan. Berikut rumus rata-rata jumlah embrio somatik :

$$\text{Rata-rata jumlah embrio somatik} = \frac{\text{Jumlah embrio yang terbentuk pada eksplan per satuan percobaan}}{\text{Jumlah eksplan per satuan percobaan}}$$

3. Persentase eksplan yang membentuk kalus embriogenik.

Pengamatan persentase eksplan yang membentuk kalus embriogenik dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik pada setiap satu satuan percobaan. Berikut rumus persentase eksplan yang membentuk kalus embriogenik :

$$\% \text{ eksplan yang Membentuk kalus Embriogenik} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk kalus embriogenik per satuan percobaan}}{\text{Jumlah eksplan per satuan percobaan}}$$