

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2009 hingga bulan Desember 2009 yang bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Gedung Bioteknologi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan tanam yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah *leaflet* kacang tanah kultivar Jerapah dan Sima. Benih kacang tanah diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Kacang-Kacangan dan Umbi-Umbian Malang (Balitkabi Malang). Bahan-bahan kimia sesuai dengan formula media MS (Murashige dan Skoog, 1962), sukrosa, picloram 16 μM , agar merek *Swallow Globe*, aquades, spiritus, natrium hipoklorit/Bayclin, Tween-20, KOH 0,1N, HCl 0,1N, dan air steril.

Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik, kompor gas, panci berlapis enamel, botol kultur, alat-alat gelas (labu takar, erlenmeyer, pipet, gelas piala, beaker), aluminium foil, plastik, karet hisap, gelas ukur, pH meter, *autoclave*, pinset, gunting, scalpel, lampu *flourescent*, rak kultur, dan *air conditioner*.

3.3 Metode Penelitian

Percobaan pada kedua kultivar kacang tanah Jerapah dan Sima dilaksanakan dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan 10 ulangan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 1 botol yang berisi 5 eksplan *leaflet* kacang tanah. Perlakuan yang diterapkan pada setiap kultivar adalah berbagai konsentrasi sukrosa yaitu 0, 10, 20, 30, dan 40 g/l. Untuk variabel jumlah embrio, homogenitas ragam diuji dengan uji Bartlett. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam. Perbedaan nilai tengah perlakuan diuji dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf nyata 5%.

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Peralatan yang digunakan meliputi botol-botol kultur, alat-alat diseksi, dan alat-alat gelas yang dicuci terlebih dahulu. Alat-alat tersebut kemudian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 30 menit pada temperatur 121 °C dengan tekanan 1.2 kgf/cm².

3.4.2 Media perlakuan

Media tanam yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog, 1962). dengan penambahan picloram 16 µM. Pada media perlakuan ditambahkan dengan berbagai konsentrasi sukrosa masing-masing dengan konsentrasi 0, 10, 20, 30, dan 40 g/l. Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 ulangan.

Untuk pematat media ditambahkan agar *swallow globe* sebanyak 6 g/l dan sebelum ditambahkan agar diatur terlebih dahulu diukur pH menjadi 5,8 dengan menggunakan pH meter dan menambahkan 1 N KOH atau 1 N HCl.

Kemudian media dimasak hingga mendidih, setelah itu tuangkan kurang lebih 30 ml ke botol-botol kultur yang sebelumnya sudah disterilisasi menggunakan *autoclave*. Botol-botol yang sudah terisi media ditutup dengan aluminium foil dilapisi dengan plastik dan diikat dengan karet gelang. Botol kultur kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15—20 menit pada tekanan 1,2 kg/cm².

3.4.3 Eksplan

Eksplan yang ditanam adalah bagian *leaflet* dari kacang tanah yang diambil dengan menggunakan pisau *scalpel* dengan hati-hati karena *leaflet* kacang tanah mudah sekali rusak. Sebelum *leaflet* diambil dari benih kacang tanah, benih disterilisasi terlebih dahulu dalam larutan yang terdiri dari campuran aquades 150 ml, ditambahkan dengan 50 ml natrium hipoklorit/bayclin (30%) dan 10 tetes tween 20, dikocok selama 15 menit hingga benih berubah warnanya menjadi putih. Kemudian benih kacang tanah dibilas sebanyak 3 kali dengan air steril.

3.4.4 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan secara aseptik dalam *laminar air flow cabinet* secara aseptik menggunakan alat pisau *scalpel* dan pinset yang sebelumnya

disterilisasi dengan cara mencelupkan pisau scalpel dan pinset ke dalam botol yang berisi spirtus dan membakarnya.

Tahap-tahap pengambilan eksplan yaitu :

- (1) Mengeluarkan benih kacang tanah dari polongnya dan memilih benih yang sehat, yaitu benih yang utuh, mulus, besarnya normal, tidak busuk, dan kulit arinya tidak kusam.
- (2) Membelah benih menjadi dua bagian dan mengambil benih yang mempunyai embrio beserta *leafletnya*.
- (3) Memisahkan *leaflet* dari embrio dan porosnya dengan hati-hati karena *leaflet* kacang tanah mudah rusak. Satu benih kacang tanah jumlah eksplan yang dapat diambil berkisar 5—8 *leaflet*.
- (4) *Leaflet* siap ditanam ke dalam botol yang berisi media agar, tiap botol ditanam sebanyak 5 *leaflet*.

Subkultur dilakukan setiap satu bulan sekali dengan media yang baru dengan konsentrasi sukrosa sesuai dengan perlakuan.

3.4.5 Ruang kultur

Eksplan yang sudah di tanam dalam botol diletakkan dalam ruang kultur yang bersuhu $\pm 24^{\circ}\text{C}$ dengan tidak ada pencahayaan atau dalam kondisi gelap.

3.4.6 *Variabel yang diamati*

Pengamatan rata-rata jumlah embrio somatik dan persentase kalus embriogenik dilakukan pada minggu ke-12. Variabel yang diamati adalah:

1. Persentase eksplan yang membentuk kalus embriogenik dilakukan dengan menghitung jumlah kalus embriogenik dibagi dengan total kalus yang terbentuk.
2. Rata-rata jumlah embrio somatik yang terbentuk per eksplan.