# III. BAHAN DAN METODE

## 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan / Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan mulai Maret 2013 sampai dengan Mei 2013.

## 3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih kedelai 4 varietas yaitu Tanggamus, Grobogan, Argomulyo, dan Ijen yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian Malang, 12 N HCl, NaClO (Sunklin), air suling, spirtus, gula, agar, air steril, KOH 1 N, HCl 1 N, zat-zat kimia penyusun media MS (Murashige dan Skoog) dan benziladenin (BA).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kultur, pinset, skapel dan mata pisau no.15, cawan petri, bunsen, alumunium foil, botol sprayer, *laminar airflow*, erlenmeyer, gelas, desikator, plastik, timbangan elektrik, autoklaf, pH-meter, pipet tetes, pipet volumetrik, *handsprayer*, *magnetic stirer*, kompor gas, gunting, labu takar, rak kultur dengan lampu 40 watt, karet gelang, tisu, kamera, dan alat tulis.

## 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok. Perlakuan yang diterapkan dalam penelitian ini disusun secara faktorial 4x2 kombinasi dua faktor yaitu varietas (Argomulyo, Ijen, Tanggamus, Grobogan) dan metode prakultur (imbibisi 20 jam atau pengecambahan 6 hari) dengan 5 ulangan. Pengelompokkan berdasarkan waktu tanam untuk setiap ulangan (Tabel 9). Setiap satuan percobaan terdiri dari empat eksplan buku kotiledon kedelai. Setelah dilakukan pra-kultur, baik melalui imbibisi 20 jam atau pengecambahan 6 hari, eksplan buku kotiledon ditumbuhkan pada media inisiasi tunas yang mengandung BA 0,75 mg/L.

Homogenitas ragam data antarperlakuan (pra-kultur dan varietas) diuji dengan menggunakan uji Bartlett. Selanjutnya, data yang diperoleh dianalisis ragam. Bila analisis ragam terpenuhi, data dilakukan pemisahan nilai tengah. Pemisahan nilai tengah antarperlakuan dilihat dengan menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%. Pada data yang diperoleh dari hasil pengakaran, dilakukan uji t-student untuk membandingkan nilai rata-rata perlakuan.

## 3.4 Pelaksanaan Penelitian

### *3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan*

Peralatan yang digunakan untuk menanam harus steril. Alat-alat logam dan gelas disterilisasi terlebih dahulu dengan *autoklave* selama 30 menit pada suhu 121$^{o}$C dengan tekanan 1,2 kg/cm$^{3}$. Sterilisasi alat-alat diseksi dilakukan baik sebelum

maupun sesudah digunakan dengan cara mencelupkan ke dalam spirtus lalu dibakar dengan pembakar bunsen.

*3.4.2 Pembuatan Media Kultur*

Media tanam yang digunakan dalam penelitian ini ialah media MS (Murashige dan Skoog) (Tabel 4) serta media MS yang diformulasikan dengan BA 0,75 mg/l. Media MS digunakan sebagai media perkecambahan benih dengan perlakuan kecambah selama 6 hari, sedangkan media MS yang mengandung BA 0,75 mg/l merupakan media regenerasi untuk pembentukan tunas adventif. Pemadat media yang digunakan ialah agar-agar sebanyak 8 g/l. Gula yang digunakan sebanyak 30 g/l (mengandung 2% sukrosa). Derajat keasaman (pH) diatur menggunakan pH meter menjadi 5,8 dengan penambahan KOH 1 N atau HCl 1N.

Larutan media dimasak sampai mendidih lalu dituangkan ke dalam botol kultur yang telah disterilisasi, ditutup dengan plastik, dan diikat dengan karet gelang kemudian media dalam botol disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 7 menit.

*3.4.3 Sterilisasi Benih*

Sebelum diberi perlakuan pra-kultur, benih-benih kedelai disterilkan dengan menggunakan gas klorin yaitu dengan menaruh selapis benih kedelai dalam cawan petri terbuka kemudian ditempatkan berjejer dalam desikator. Gas klorin diproduksi di dalam desikator dengan cara menambahkan tetes demi tetes 3,3 ml HCl 12 N ke permukaan dinding bagian dalam gelas piala yang telah berisi

100 ml Bayclin yang berbahan aktif NaClO 5,25%. Desikator kemudian ditutup rapat dengan menambahkan vaselin disekitar pinggiran desikator kemudian dibalut dengan plastik *wrap* dan dibiarkan selama 2 x 24 jam (Gambar 1). Reaksi kimia yang terjadi didalam larutan bayclin (NaClO) yang ditetesi HCl adalah:

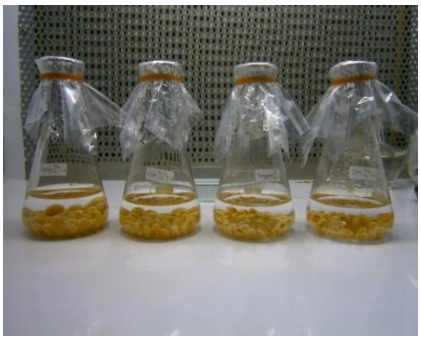
$$NaClO + 2HCl \longrightarrow H_2O + NaCl + Cl_2$$

Gambar 1. Tahapan sterilisasi benih

*3.4.4 Perlakuan pra-kultur imbibisi atau pengecambahan*

Pada perlakuan pra-kultur imbibisi, benih 4 varietas yang telah melalui proses sterilisasi masing-masing sebanyak 25-30 benih dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi air steril sehingga benih-benih tersebut terendam sepenuhnya. Perendaman benih-benih tersebut dilakukan selama 20 jam pada suhu 24 ± 2°C dengan 16 jam terang dan 8 jam gelap (Gambar 2a). Sedangkan pada perlakuan prakultur pengecambahan, masing-masing keempat varietas kedelai yang telah disterilisasi kemudian ditanam ke dalam medium MS (MS tanpa zat pengatur tumbuh) (Gambar 2b). Masing-masing benih kedelai yang ditanam adalah 4-5

benih per botol kemudian dikecambahkan selama 5-6 hari pada suhu 24 ± 2°C dengan 16 jam terang dan 8 jam gelap.



(a)

(b)

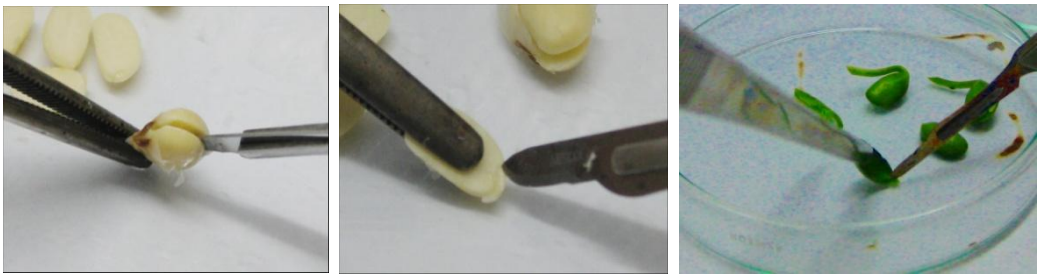
Gambar 2. Perlakuan pra-kultur biji kedelai (a) imbibisi dan (b) pengecambahan.

*3.4.5 Pengkulturan pada media inisiasi tunas*

Proses pengkulturan pada media inisiasi tunas dilakukan setelah perlakuan pra-kultur selesai. Pada perlakuan pra-kultur imbibisi, air yang terdapat didalam erlenmeyer yang berisi benih dibuang kemudian dilanjutkan dengan membelah benih secara vertikal menjadi dua bagian kotiledon (Gambar 3a). Pucuk poros embrio di atas buku kotiledon dibuang dan selanjutnya dibuat 5-7 goresan sepanjang 2-3 mm sejajar dengan poros embrio pada buku kotiledon menggunakan skapel dengan mata pisau no. 15 (Gambar 3b). Eksplan buku kotiledon dari kecambah yang berumur 20 jam tersebut dikulturkan pada media inisiasi tunas (MS) yang mengandung BA 0,75 mg/l. Eksplan dikulturkan selama 3-4 minggu pada ruang bersuhu 25°C (18 jam terang dan 6 jam gelap).

Pada perlakuan pra-kultur pengecambahan 6 hari yakni kotiledon dipisahkan dari akarnya dengan cara memotong hipokotil 3-5 mm di bawah buku kotiledon. Dua

kotiledon dipisahkan dengan cara membelah vertikal sepanjang hipokotil menggunakan pisau skapel no.15. Pucuk poros embrio di atas buku kotiledon dibuang, kemudian dibuat 5-7 goresan sejajar dengan poros embrio pada buku kotiledon (Gambar 3c). Eksplan buku kotiledon dari kecambah yang telah berumur 5-6 hari tersebut dikulturkan pada media inisiasi tunas yang mengandung BA 0,75 mg/l. Posisi eksplan pada media diletakkan condong dengan sudut 120-150°, permukaan adaksial menghadap ke atas dan bagian yang dicacah dibenamkan dalam media. Eksplan dikulturkan selama 3-4 minggu pada ruang bersuhu 24 ± 2°C dengan 16 jam terang dan 8 jam gelap.



(a) (b) (c)

Gambar 3. Pengulturan pada media inisiasi tunas. (a) dua buku kotiledon dipisahkan dengan cara membelah vertikal sepanjang hipokotil pada benih perlakuan imbibisi, (b) eksplan imbibisi disayat pada poros embrio, (c) eksplan kecambah disayat pada poros embrio.

*3.4.6 Subkultur*

Setelah berumur dua minggu pada medium inisiasi, dilakukan subkultur melalui pemotongan permukaan bawah eksplan, dan bagian atas eksplan yang meliputi bakal tunas adventif kemudian dipindahkan ke medium inisiasi baru. Setelah itu,

medium inisiasi baru yang telah berisi eksplan diinkubasi kembali selama 2 minggu dalam ruang kultur.

*3.4.7 Pengakaran*

Perakaran dengan kualitas yang baik sangat menentukan keberhasilan saat tahap aklimatisasi. Untuk itu formulasi media yang tepat sangat menentukan kualitas akar. Setelah berumur 40 hari setelah tanam (hst), eksplan dikeluarkan dari dalam botol dan dipisahkan dari media kultur (Gambar 4a). Tunas-tunas adventif yang tumbuh pada setiap eksplan dipisahkan satu per satu (Gambar 4b). Tunas-tunas yang memiliki lebih dari 3 daun dikulturkan ke dalam medium pengakaran masing-masing 1 tunas per botol (Gambar 4c). Hal ini bertujuan agar akar yang muncul dari tunas dapat tumbuh dengan baik. Medium pengakaran yang digunakan adalah media 1/2 MS dan media 1/2 MS yang mengandung NAA 0,5 mg/l. Masing-masing perlakuan ditanam ke dalam dua media pengakaran tersebut. Pengamatan tunas yang membentuk akar fungsional dilakukan pada umur 3 minggu setelah tanam (mst) selama di medium pengakaran.

(a) (b) (c)

Gambar 4. Tahapan pengakaran tunas adventif. (a) eksplan imbibisi dikeluarkan dari media kultur, (b) tunas adventif yang tumbuh pada eksplan dipisahkan satu per satu, (c) tunas adventif dikulturkan ke dalam medium pengakaran masing-masing 1 tunas per botol

*3.4.8 Aklimatisasi*

Setelah berumur 3 minggu setelah di medium pengakaran, tunas-tunas yang telah membentuk akar (planlet) selanjutnya di aklimatisasi dalam media campuran *cocopeat* dan arang sekam dengan perbandingan 1:1. Media campuran tersebut sebelumnya telah disterilkan dengan merendamnya dalam air mendidih selama semalam.

Proses aklimatisasi planlet meliputi penyiapan planlet, perendaman dalam larutan fungisida, penanaman, serta pengondisian iklim tanaman. Penyiapan planlet dilakukan dengan cara mengeluarkan planlet dari botol kemudian mencuci bersih akar planlet tersebut dari sisa-sisa agar yang masih menempel dengan air mengalir. Tujuan pencucian akar tersebut ialah untuk menghindari pertumbuhan jamur melalui sisa-sisa agar. Oleh karena itu, akar tersebut harus direndam dalam larutan fungisida selama 3 menit. Setelah 3 menit, planlet siap ditanam dalam pot kecil berisi media campuran. Setelah itu, planlet disungkup menggunakan plastik transparan dengan tujuan menjaga kelembaban tanaman baru tersebut. Intensitas cahaya dinaikkan bertahap dan kelembaban diturunkan bertahap.

## 3.5 Variabel Pengamatan

Untuk mengetahui efisiensi regenerasi *in vitro* kedelai secara organogenesis melalui perlakuan pra-kultur, maka dilakukan pengamatan pada variabel berikut:

(1) <u>Persentase eksplan yang menghasilkan tunas adventif (PEMTA)</u> Persentase eksplan dihitung berdasarkan jumlah eksplan yang membentuk tunas adventif dibagi jumlah seluruh eksplan per 100 %.

(2) Rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan (RJTA). Tunas yang dihitung adalah jumlah seluruh tunas adventif yang tumbuh dibagi jumlah eksplan yang membentuk tunas.

(3) Proporsi tunas yang membentuk akar fungsional (PTMAF). Pengamatan dilakukan setelah tunas dipindahkan ke dalam media pengakaran. Tunas yang mengalami perkembangan akar secara terus menerus (akar fungsional) yang diamati selanjutnya diaklimatisasi.