

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung, dimulai dari Maret sampai dengan Mei 2013.

#### **3.2 Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antarlain benih kedelai varietas Detam 1, Detam 2, Burangrang, dan Panderman, HCl, bayclin, deterjen, air suling, spirtus, gula pasir, agar-agar, air steril, KOH 1 N, HCl 1 N, larutan stok penyusun media dasar MS (Murashige and Skoog), zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin yaitu BA dan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin yaitu NAA.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antarlain botol kultur, pinset, skapel nomor 3, *blade* (pisau) nomor 15, cawan petri (*petri dish*), bunsen burner, korek api gas, *laminar air flow*, erlenmeyer, labu takar, gelas ukur, gelas piala, botol tera, desikator, vaselin, plastik wrap, kertas wrap, sarung tangan, masker, plastik bening, timbangan elektrik, autoklaf steril, autoklaf Bedenburg, bak air, ember, kereta dorong, keranjang plastik, pH-meter, pipet tetes, pipet volumetrik,

*handsprayer, magnetic stirrer, dirigen, kompor gas, gunting, kertas alas menimbang, karet gelang, tisu, kapas, kamera, dan alat tulis.*

### **3.3 Metode Penelitian**

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK). Perlakuan yang diterapkan terdiri dari dua faktor yaitu varietas (Detam 1, Detam 2, Burangrang dan Panderman) dan metode pra-kultur (imbibisi 20 jam dan kecambah 6 hari). Metode pra-kultur adalah perlakuan yang diberikan terhadap benih kedelai yang digunakan sebelum ditanam pada media inisiasi tunas. Perlakuan disusun secara faktorial (4x2) dengan 5 ulangan. Setiap satuan percobaan terdiri dari empat eksplan buku kotiledon kedelai. Tata letak dibuat dari pengelompokkan berdasarkan waktu tanam untuk setiap ulangan (Gambar 7 pada lampiran). Setelah metode pra-kultur melalui perlakuan imbibisi 20 jam maupun kecambah 6 hari dilakukan, selanjutnya eksplan buku kotiledon ditanam pada media inisiasi tunas yaitu MS + BA 0,75 mg/l. Homogenitas ragam data antar perlakuan diuji dengan menggunakan uji Bartlett dan uji lanjut dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5%.

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### *3.4.1 Sterilisasi Alat*

Botol kultur disterilisasi menggunakan autoklaf Bedenbug dengan tekanan 1,2 kg/cm<sup>3</sup> dan suhu 121°C selama 3 jam, setelah itu direndam didalam air yang telah berisi deterjen dan bayclin selama 24 jam. Kemudian, botol tersebut dicuci bersih dan direndam ke dalam air panas dari alat destilator selama 15 menit.

Selanjutnya, botol ditiriskan hingga kering lalu ditutup dengan plastik bening dan diikat dengan karet gelang. Botol tersebut disterilisasi lagi dengan menggunakan autoklaf steril selama 30 menit dengan tekanan  $1,2 \text{ kg/cm}^3$  dan suhu  $121^\circ\text{C}$ . Setelah proses sterilisasi selesai, maka botol tersebut dapat disimpan untuk digunakan dalam pembuatan media tanam. Sedangkan, untuk alat-alat seperti petridish, gunting, skapel, pinset, botol scot, air steril, kapas dan tisu dibungkus dahulu dengan menggunakan kertas putih bersih lalu dimasukkan kedalam plastik dan diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf steril selama 30 menit.

#### 3.4.2 *Pembuatan Media Kultur*

Media tanam yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS dan MS + BA  $0,75 \text{ mg/l}$ . Media MS digunakan sebagai media perkecambahan benih pada perlakuan kecambah selama enam hari, sedangkan media MS yang mengandung BA  $0,75 \text{ mg/l}$  merupakan media inisiasi untuk pembentukan tunas adventif. Pemat media yang digunakan adalah agar-agar sebanyak  $8 \text{ g/l}$ . Gula yang digunakan sebanyak  $30 \text{ g/l}$ . Derajat keasaman (pH) diatur menggunakan pH meter sampai menunjukkan pH  $5,8$  dengan penambahan KOH  $1 \text{ N}$  atau HCL  $1 \text{ N}$ . Larutan media yang telah dibuat lalu dimasak sampai mendidih. Kemudian, larutan media tersebut dituangkan ke dalam botol kultur yang telah disterilisasi, ditutup dengan plastik, dan diikat dengan karet gelang. Selanjutnya media didalam botol steril tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf steril pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dengan tekanan  $1 \text{ atm}$  selama 7 menit.

### 3.4.3 *Sterilisasi Benih Sumber*

Cara sterilisasi dilakukan dengan cara menaruh selapis benih kedelai dari masing-masing varietas didalam cawan petri terbuka kemudian ditempatkan mengelilingi gelas piala yang sudah berisi campuran HCl dan Bayclin didalam desikator.

Kemudian, desikator ditutup rapat dengan memberikan vaselin dibagian tepi.

Desikator lalu ditutup dengan plastik wrap. Sterilisasi benih berlangsung selama 2 x 24 jam.

Benih kedelai dari empat varietas disterilkan menggunakan gas klorin. Gas klorin diproduksi di dalam desikator dengan cara menambahkan tetes demi tetes 3 ml HCl 12 N ke permukaan dinding bagian dalam gelas piala yang telah berisi 100 ml Bayclin yang berbahan aktif NaClO 5,25%. Reaksi kimia gas klorin tersebut sebagai berikut:



### 3.4.4 *Kecambah 6 Hari*

Benih kedelai dari empat varietas yang telah disterilisasi kemudian ditanam ke dalam MS. Jumlah benih yang ditanam adalah lima benih per botol. Botol-botol media yang telah ditanami benih kedelai tersebut diinkubasi selama 6 hari pada suhu  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  dengan kondisi terang selama 16 jam dan gelap selama 8 jam.

### 3.4.5 *Imbibisi 20 Jam*

Benih kedelai dari empat varietas yang telah melalui proses sterilisasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 100 ml yang berisi air steril 40-50 ml sampai benih-benih tersebut terendam sepenuhnya. Perendaman benih-benih tersebut dilakukan selama 20 jam pada suhu  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 3.4.6 *Inisiasi Tunas*

Pada perlakuan kecambah enam hari, proses inisiasi tunas diawali dengan memisahkan kotiledon dari akarnya dengan cara memotong hipokotil 3-5 mm di bawah buku kotiledon. Dua kotiledon dipisahkan dengan cara membelah vertikal menggunakan pisau skapel nomor 15. Pucuk poros embrio di atas buku kotiledon dibuang, kemudian dibuat 5 sampai 7 kali sayatan sejajar dengan poros embrio pada buku kotiledon (Gambar 1).



Gambar 1. Penyayatan sejajar dengan poros embrio (ditunjukkan oleh panah berwarna merah) pada eksplan buku kotiledon varietas Detam 1.

Pada perlakuan imbibisi 20 jam, diawali dengan membuang air yang terdapat didalam erlenmeyer yang berisi benih kedelai. Kemudian dilanjutkan dengan membelah benih secara vertikal menjadi dua bagian kotiledon. Proses selanjutnya sama seperti pada perlakuan kecambah. Eksplan buku kotiledon dari perlakuan kecambah enam hari dan imbibisi 20 jam tersebut dikulturkan pada media inisiasi tunas yang mengandung BA 0,75 mg/l (media MS + BA 0,75). Penanaman eksplan pada media inisiasi tunas dilakukan dengan cara memosisikan eksplan condong dengan sudut 120°, permukaan adaksial menghadap ke atas dan bagian yang dicacah ditanamkan dalam media. Eksplan tersebut dikulturkan selama dua

minggu pada suhu  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  dengan kondisi terang selama 16 jam dan kondisi gelap selama 8 jam.

#### 3.4.7 *Subkultur*

Setelah berumur dua minggu pada media inisiasi tunas, dilakukan pemotongan bagian bawah dekat tempat munculnya tunas adventif dan bagian atas eksplan yang meliputi bakal tunas adventif dipindahkan ke media inisiasi baru. Tunas adventif yang memiliki lebih dari tiga daun sudah bisa dikulturkan ke dalam media pengakaran.

#### 3.4.8 *Pengakaran*

Setelah tunas adventif dari masing-masing eksplan buku kotiledon terbentuk, dilakukan pemisahan tunas adventif dari eksplan buku kotiledon tersebut.

Selanjutnya tunas adventif dari masing-masing perlakuan pra-kultur ditanam pada media pengakaran  $\frac{1}{2}$  MS dan  $\frac{1}{2}$  MS + NAA 0,5 mg/l. Tunas adventif yang telah ditanam pada media pengakaran tersebut diletakkan di ruang kultur dan diamati selama dua minggu pada suhu  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  dengan kondisi terang selama 16 jam dan kondisi gelap selama 8 jam.

### 3.5 **Variabel Pengamatan**

Variabel yang diamati pada penelitian ini sebagai berikut:

- (1) Rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan (RJTAPE).

Variabel ini dihitung berdasarkan jumlah tunas adventif yang tumbuh dibagi jumlah eksplan yang membentuk tunas.

- (2) Persentase eksplan yang membentuk tunas adventif (PEMTA).

Variabel ini dihitung berdasarkan jumlah eksplan yang membentuk tunas adventif dibagi jumlah seluruh eksplan dikali 100 %.

- (3) Persentase tunas adventif yang membentuk akar fungsional (PTMAF).

Variabel ini dihitung berdasarkan jumlah tunas adventif yang berakar dibagi jumlah tunas adventif yang ditanam di media pengakaran lalu dikali 100%.