

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian dan Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif merupakan metode yang digunakan untuk mendeskripsikan atau memberi gambaran terhadap objek yang diteliti melalui data atau sampel yang telah terkumpul sebagaimana adanya (Sugiyono, 2009). Data yang diambil dalam penelitian ini berupa data kualitatif meliputi respons eksplan batang *C. lacryma-jobi* L. yang diperbanyak secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yong dkk. (2012), bahwa media MS dengan penambahan 2,4-D 0,4 mg/L+Kinetin 1,5 mg/L+NAA 0,8 mg/L merupakan kombinasi yang paling optimal untuk induksi kalus embrionik batang *C. lacryma-jobi* L. Auksin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan 1-Asam Naftalenasetat (NAA) serta Sitokinin yang dipakai adalah kinetin. Desain penelitian yang digunakan yaitu kombinasi zat pengatur tumbuh yang digunakan sebanyak 4 kombinasi yang tertuang dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1

*Kombinasi zat pengatur tumbuh yang digunakan*

2,4-D	Kinetin	NAA	Kode Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh
0,4 mg/l	1,5 mg/l	0,4 mg/l	A
0,4 mg/l	1,5 mg/l	0,6 mg/l	B
0,4 mg/l	1,5 mg/l	0,8 mg/l	C
0,4 mg/l	1,5 mg/l	1,0 mg/l	D

#### 3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Botani, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia pada bulan Februari sampai Juli 2019.

#### 3.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan yakni batang *Coix lacryma-jobi* L. liar yang ditanam di kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia. Biji berasal dari

eksplan yang diambil dari sawah yang berada di daerah Cikaramas, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Eksplan yang digunakan yakni batang bagian epikotil ruas pertama dan kedua dekat dengan meristem apeks pucuk yang berumur 1 minggu.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Persiapan Pelaksanaan Penelitian**

##### **3.4.1.1 Persiapan Eksplan**

Tahap persiapan diawali dengan studi lapangan, yaitu observasi lokasi tanaman hanjeli liar (*Coix lacryma-jobi* L.) dari desa Cikaramas Kabupaten Sumedang, Jawa Barat untuk mendapatkan tanaman. Biji tanaman tersebut ditanam di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia. Sebelum melakukan penanaman, biji direndam di dalam air terlebih dahulu selama 24 jam yang bertujuan untuk terjadinya proses imbibisi pada biji, lalu biji *C. lacryma-jobi* L. ditanam dalam *polybag* yang sudah berisi tanah.

##### **3.4.1.2 Pembuatan Medium**

###### **3.4.1.2.1 Pembuatan Stok Medium dan Hormon**

Medium yang digunakan dalam penelitian kultur *in vitro* pada batang *Coix lacryma-jobi* L. adalah medium *Murashige dan Skoog MS* (Yong dkk., 2012). Dalam pembuatan medium, terlebih dahulu dibuat larutan stok yang terdiri dari makronutrien, mikronutrien, dan vitamin (Lampiran 3). Larutan stok dibuat bertujuan untuk mempermudah dalam penimbangan karena biasanya larutan yang digunakan dalam setiap komposisi medium sangat sedikit. Larutan tersebut selanjutnya disimpan dalam wadah gelap, lalu ditutup rapat menggunakan plastik, karet dan *aluminium foil*. Larutan stok disimpan dalam lemari es.

###### **3.4.1.2.1.1 Larutan Stok A ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) = 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Larutan stok makronutrien A dibuat untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 16.5 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larutan homogen. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml. Larutan kemudian dituangkan ke dalam gelas kimia serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan stok A dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik,

serta karet. Botol diberi label makronutrien A ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Penggunaan makronutrien A ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) untuk 1 L medium MS adalah 10 ml.

#### 3.4.1.2.1.2 Larutan Stok B ( $\text{KNO}_3$ ) = 100 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makronutrien B untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 19.9 g/l  $\text{KNO}_3$  ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan pengadukan larutan stok menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml di dalam gelas ukur. Larutan dipindahkan kembali ke dalam gelas kimia untuk dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila larutan B sudah homogen, dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, dan karet. Botol diberi label makronutrien B ( $\text{KNO}_3$ ). Penggunaan untuk 1 L medium MS adalah 10 ml.

#### 3.4.1.2.1.3 Larutan Stok C ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) = 100 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok makronutrien C dibuat untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 3.322 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larutan homogen. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml. Larutan kemudian dituangkan ke dalam gelas kimia serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan stok C dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, serta karet. Botol diberi label makronutrien C ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Penggunaan larutan stok C adalah 10 ml untuk 1 L medium MS.

#### 3.4.1.2.1.4 Larutan Stok D ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) = 100 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makronutrien D untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 3.7 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan pengadukan larutan stok menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml di dalam gelas ukur. Larutan dipindahkan kembali ke dalam gelas kimia untuk dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila larutan D sudah homogen, dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, dan karet. Botol diberi label

makronutrien D ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Penggunaan untuk 1 L medium MS adalah sebanyak 10 ml.

#### 3.4.1.2.1.5 Larutan Stok E ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) = 100 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok makronutrien E dibuat untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 1.7 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larutan homogen. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml. Larutan kemudian dituangkan ke dalam gelas kimia serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan stok E dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, serta karet. Botol diberi label makronutrien E ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Penggunaan larutan stok E adalah 10 ml untuk 1 L medium MS.

#### 3.4.1.2.1.6 Larutan Stok F (Mikronutrien) = 100 ml (1000 kali konsentrasi)

Larutan stok F untuk 1000 kali konsentrasi dibuat dengan melarutkan KI 0.83 g/l,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2 g/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  16.9 g/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6 g/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25 g/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025 g/l, dan  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025 g/l dalam gelas kimia yang berisi akuades 50 ml. Larutan stok diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml di dalam gelas ukur. Larutan dipindahkan kembali ke dalam gelas kimia untuk dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila larutan mikronutrien sudah homogen, dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, dan karet. Botol diberi label stok F (mikronutrien). Penggunaan untuk 1 L medium MS adalah 0,1 ml.

#### 3.4.1.2.1.7 Larutan Stok G (Zat Besi) = 100 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok G terdiri dari  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  sebanyak 0.373 g/l dan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 0.278 g/l. Kedua zat tersebut dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan pengadukan larutan menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml di dalam gelas ukur. Larutan dipindahkan kembali ke dalam gelas kimia untuk dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila larutan zat besi sudah homogen, dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu

ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, dan karet. Botol diberi label stok G (zat besi). Penggunaan untuk 1 L medium MS adalah sebanyak 10 ml.

#### 3.4.1.2.1.8 Larutan Stok H (Vitamin) = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok H untuk 100 kali konsentrasi dibuat dengan melarutkan Tiamina HCl 0.01 g/l, Asam Nikotinat 0.05 g/l, Piridoksina HCl 0.05 g/l, dan Glisina 0.20 g/l dalam gelas kimia yang berisi akuades 40 ml. Larutan stok diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml di dalam gelas ukur. Larutan dipindahkan kembali ke dalam gelas kimia untuk dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila larutan vitamin sudah homogen, dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, dan karet. Botol diberi label stok H (vitamin). Penggunaan untuk 1 L medium MS adalah 1 ml.

#### 3.4.1.2.1.9 Larutan Stok I (Myo-inositol) = 100 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok I untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 1.0 g/l myo-inositol ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan pengadukan larutan stok menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml di dalam gelas ukur. Larutan dipindahkan kembali ke dalam gelas kimia untuk dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila larutan I sudah homogen, dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, dan karet. Botol diberi label stok I (myo-inositol). Penggunaan untuk 1 L medium MS adalah sebanyak 10 ml.

#### 3.4.1.2.1.10 Larutan Stok ZPT A (2,4-D 0.4 mg/l) = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok ZPT A dibuat untuk 100 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 0.04 g/l 2,4-D dengan NaOH ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larutan homogen. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml. Larutan kemudian dituangkan ke dalam gelas kimia serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan stok ZPT A dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*,

plastik, serta karet. Botol diberi label ZPT A (2,4-D 0,4 mg/l). Penggunaan larutan stok ZPT A adalah 1 ml untuk 1 L medium MS.

#### 3.4.1.2.1.11 Larutan Stok ZPT B (Kinetin 1.5 mg/l) = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok ZPT B untuk 100 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 0.15 mg/l kinetin dengan HCl ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan pengadukan larutan stok menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml di dalam gelas ukur. Larutan dipindahkan kembali ke dalam gelas kimia untuk dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila larutan stok ZPT B sudah homogen, dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, dan karet. Botol diberi label stok ZPT B (kinetin 1.5 mg/l). Penggunaan stok ZPT B untuk 1 L medium MS adalah sebanyak 1 ml.

#### 3.4.1.2.1.12 Larutan Stok ZPT C (NAA 0.2 mg/l) = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok ZPT C dibuat untuk 100 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 0.02 g/l NAA dengan NaOH ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larutan homogen. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml. Larutan kemudian dituangkan ke dalam gelas kimia serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan stok ZPT C dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, serta karet. Botol diberi label ZPT C (NAA 0.2 mg/l). Penggunaan larutan stok ZPT C adalah 1 ml untuk 1 L medium MS.

#### 3.4.1.2.2 Pembuatan Stok Antibiotik *Cefotaxime* dan Medium MS+*Cefotaxime*

Pembuatan stok medium MS+*cefotaxime* bertujuan untuk mengurangi kontaminasi bakteri yang berasal dari *C. lacryma-jobi* L. sebanyak 10% (T. Puspita 2019, komunikasi pribadi, 8 Mei). Untuk membuat stok antibiotik *cefotaxime* 300 ppm, dilakukan dengan melarutkan 1 g antibiotik *cefotaxime* dengan akuades steril sebanyak 10 ml, usahakan tutup berwarna abu tidak terkena tangan. Botol antibiotik *cefotaxime* ditutup menggunakan *aluminium foil* dan *plastic wrap*,

penggunaan larutan stok antibiotik *cefotaxime* adalah 3 ml untuk 1 L medium MS. Pembuatan Medium MS+larutan antibiotik *cefotaxime* tanpa zat pengatur tumbuh dilakukan dengan cara yakni medium MS disterilkan terlebih dahulu, medium yang sudah disterilkan ditambahkan antibiotik *cefotaxime* digunakan saat suhunya hangat-hangat kuku dan dilakukan didalam *Laminar Air Flow* (Gambar 3.1). Medium MS dan *cefotaxime* dikocok sampai homogen, medium dituangkan pada botol kultur sebanyak 10 ml (Gambar 3.2). Medium MS+larutan antibiotik *cefotaxime* dapat dipakai setelah 4-5 hari.



Gambar 3.1 Penambahan *cefotaxime* ke dalam Medium MS



Gambar 3.2 Penuangan Medium MS+*cefotaxime* pada botol kultur

#### 3.4.1.2.3 Pembuatan Medium

Pembuatan 1 L medium untuk 4 kombinasi dilakukan dengan masing-masing larutan stok diambil sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan dan dicampurkan ke dalam gelas kimia yang terlebih dahulu diisi dengan akuades sebanyak 500 ml, serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larutan tercampur secara homogen, ditambahkan 30 g/l sukrosa dan ditambah dengan akuades sebanyak 500 ml. Medium MS ini dibagi ke dalam 4 gelas kimia dengan volume masing-masing sebesar 200 ml. Setiap gelas kimia yang berisi 200 ml larutanon ditambahkan zat pengatur tumbuh sesuai dengan kombinasi yang telah ditentukan dan pH medium dibuat menjadi sekitar 5,7-5,9 dengan penambahan 0,1 N NaOH dan/atau 0,1 N HCl. Setiap medium ditambah dengan akuades hingga volume akhir mencapai 250 ml dan larutan medium dimasukkan agar-agar

sebanyak 0,4 g/250 ml. Selanjutnya medium dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*, sehingga agar-agar larut dan homogen. Masing-masing kombinasi sebanyak 10 ml media dituangkan ke dalam botol kultur. Botol kultur ditutup menggunakan *aluminium foil*, plastik, karet, serta diberi label. Botol kultur disterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 1,5 atm dalam suhu 121°C selama 15 menit. Medium kemudian disimpan ditempat yang bersih sampai digunakan.

#### **3.4.1.3 Sterilisasi Alat**

Alat yang digunakan (Lampiran 2) dalam pembuatan medium seperti botol kultur, *tips mikropipet*, *aluminium foil*, gelas piala, pinset, cawan petri, kertas saring, *scalpel*, dan gelas kimia dibungkus menggunakan kertas dan plastik, disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan 1,5 atm dalam suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, alat-alat yang sudah disterilisasi kemudian disimpan ditempat yang bersih untuk digunakan dalam pembuatan medium.

#### **3.4.1.4 Sterilisasi *Laminar Air Flow***

Sebelum dilakukan penanaman, *Laminar Air Flow* disterilisasi terlebih dahulu dengan cara dibersihkan menggunakan alkohol 70%, disinari oleh *Ultra Violet* (UV) selama 1 jam, dan dialirkan udara selama 1 jam.

### **3.4.2 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.2.1 Pengambilan Eksplan**

Eksplan yang digunakan yakni batang *Coix lacryma-jobi* L. liar bagian epikotil ruas pertama dan kedua dekat dengan meristem apeks pucuk yang berukuran  $\pm 2$  cm (Gambar 3.3), berumur 1 minggu yang ditanam di kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia,. Eksplan ditanam pada medium MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D, Kinetin, dan NAA. Proses penanaman dilakukan di *Laminar Air Flow* steril.



Gambar 3.3 Eksplan batang

#### 3.4.2.2 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dibagi menjadi 2 tahap. Tahap pertama, sterilisasi dilakukan di luar *Laminar Air Flow*. Batang *Coix lacryma-jobi* L. diambil dan dipotong sepanjang 2 cm menggunakan pisau dan dimasukkan ke dalam cawan petri. Batang yang sudah dipotong, dicuci menggunakan air mengalir selama 30 menit (Gambar 3.4). Eksplan dicuci menggunakan larutan detergen 2% selama 10 menit (Gambar 3.5), kemudian dibilas menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali sampai busa-busa dari detergen tersebut menghilang.



Gambar 3.4 Pencucian eksplan menggunakan air mengalir



Gambar 3.5 Pencucian Eksplan menggunakan larutan detergen 2%

Tahap kedua, sterilisasi dilakukan didalam *Laminar Air Flow*. Eksplan batang dimasukkan ke dalam gelas ukur berukuran 250 ml yang sudah disterilisasi. Eksplan dicuci menggunakan larutan Bakterisida Agrep 0,2% selama 30 menit (Gambar 3.6), kemudian eksplan dibilas menggunakan akuades steril selama 30 menit. Eksplan dicuci menggunakan larutan Fungisida Benstar 0,2% selama 30

menit (Gambar 3.7), kemudian eksplan dibilas menggunakan akuades steril selama 30 menit. Eksplan direndam dalam alkohol 70% (Gambar 3.8), kemudian dibilas menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali. Eksplan direndam dalam Natrium hipoklorit (NaClO) 25% selama 10 menit dan dimasukkan tween 20 (sabun) sebanyak 2 tetes (Gambar 3.9), kemudian eksplan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali.



Gambar 3.6 Pencucian Eksplan dengan larutan Bakterisida Agrep 0,2%



Gambar 3.7 Pencucian Eksplan dengan larutan Fungisida Benstar 0,2%



Gambar 3.8 Perendaman eksplan dalam alkohol 70%



Gambar 3.9 Perendaman eksplan dalam Natrium hipoklorit 25%

### 3.4.2.3 Penanaman Eksplan

Batang *Coix lacryma-jobi* L. dipotong sebesar 1 cm, lalu ditanam didalam botol kultur yang berisi medium MS+*cefotaxime* dan tanpa zat pengatur tumbuh. Sebelum dimasukkan ke dalam botol kultur, eksplan dilukai terlebih dahulu dibagian yang akan diletakkan di atas medium. Eksplan yang akan ditanam berjumlah 2 eksplan yang ditanam pada 6 botol/perlakuan (Gambar 3.10). Botol kultur ditutup rapat dengan *Aluminium foil* dan *plastic wrap*, lalu botol kultur disimpan di dalam tempat gelap dengan suhu ruang. Eksplan yang ditanam di

medium MS+*cefotaxime* didiamkan hingga 3-4 hari, setelah itu eksplan disubkultur ke medium MS yang mengandung zat pengatur tumbuh. Eksplan yang ditanam, diamati setiap tiga hari sekali dalam waktu 1 bulan.



Gambar 3.10 Penanaman eksplan yang berjumlah 2 eksplan/botol

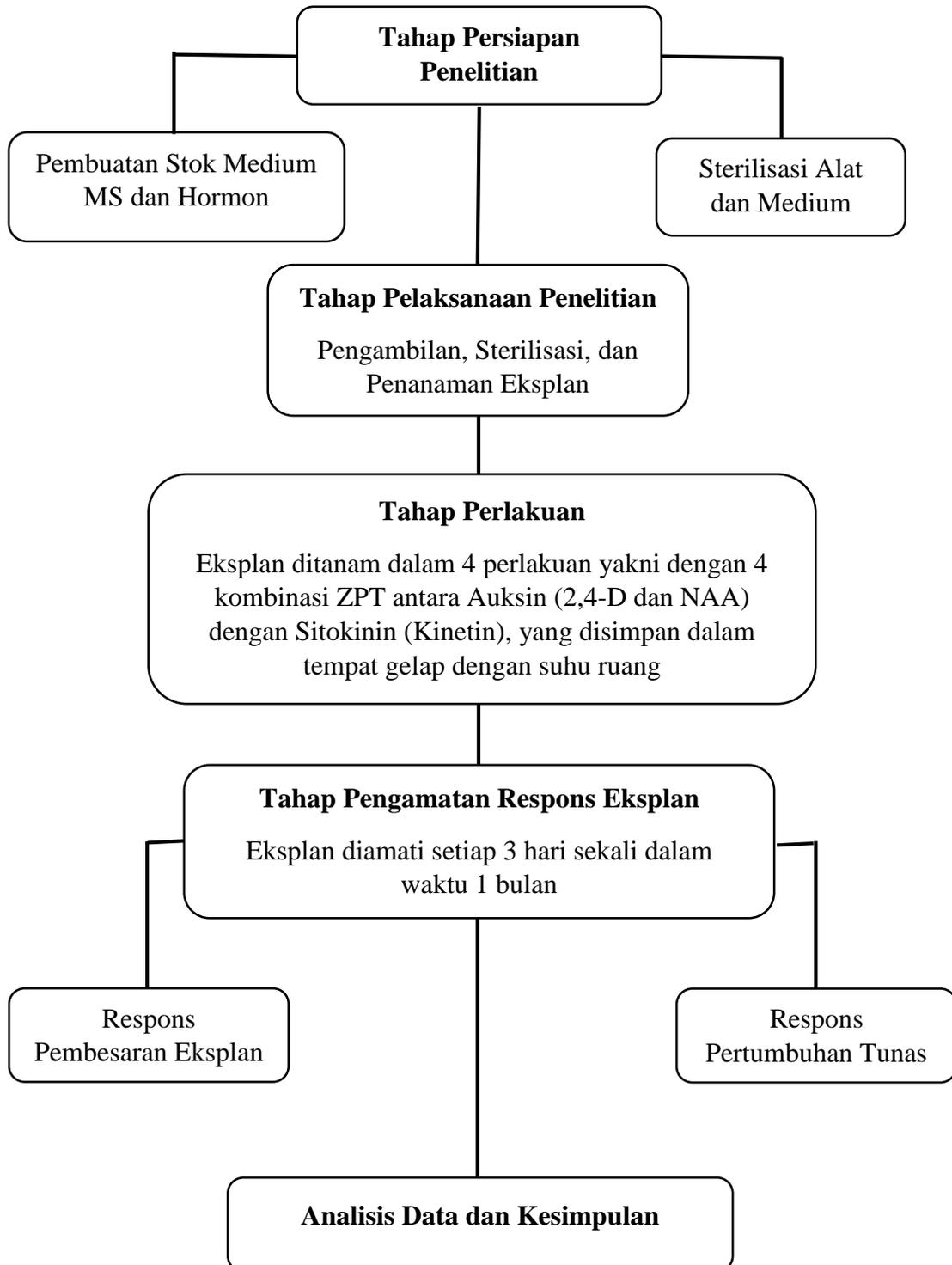
### 3.4.3 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Botol kultur yang telah berisi eksplan batang disimpan di tempat gelap dengan suhu ruang dan diamati setiap tiga hari sekali selama 1 bulan. Tiap respons seperti pembesaran eksplan dan pembentukan tunas didokumentasikan serta dihitung persentasenya dari setiap kombinasi zat pengatur tumbuh dan tiap pengulangan, kemudian dihitung rata-rata persentasenya untuk enam kali ulangan. Respons eksplan, dihitung berdasarkan Azizi dkk. (2017) :

$$\text{Persentase} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang mengalami respon tertentu}}{\text{Jumlah eksplan dalam satu botol}} \times 100\%$$

### 3.4.4 Alur Kerja

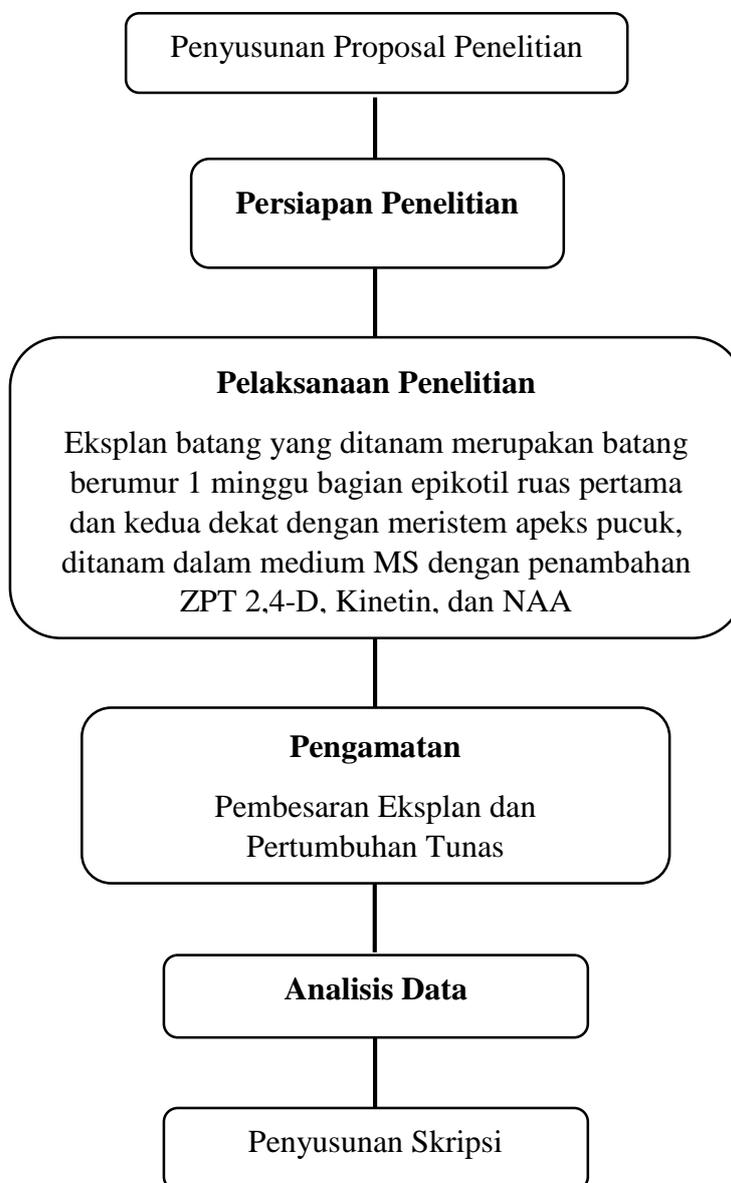
Dalam melaksanakan prosedur penelitian ini, maka dibuat alur kerja (Gambar 3.11) sebagai berikut:



Gambar 3.11 Alur Kerja

### 3.4.5 Alur Penelitian

Bagan alur penelitian (Gambar 3.12) ini adalah sebagai berikut:



Gambar 3.12 Alur Penelitian