

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen, dimana dilakukan manipulasi terhadap objek penelitian. Penelitian eksperimen juga merupakan penelitian yang berusaha mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel lainya dalam kondisi yang terkontrol secara ketat. Penelitian eksperimen merupakan metode sistematis untuk membangun hubungan yang mengandung fenomena sebab akibat (Nazir, 2014).

Desain Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Faktor pertama perlakuan yaitu konsentrasi ZPT (2,4 D 7 μ M dan BAP 4 μ M) (DB74) dan (2,4 D 9 μ M dan BAP 3 μ M) (DB93). Faktor kedua perlakuan yaitu perbedaan morfologi megagametofit (megagametofit berwarna putih dan megagametofit bening).

Variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

3.1.1 Variabel bebas:

- a. Konsentrasi ZPT (2,4 D 7 μ M dan BAP 4 μ M) dan (2,4 D 9 μ M dan BAP 2 μ M).
- b. Morfologi megagametofit *Pinus merkusii* yang berwarna putih dan bening.

3.1.2 Variabel terikat: persentase embrio somatik *Pinus merkusii* yang terinduksi.

Percobaan diulangi sebanyak enam kali ulangan, pada masing-masing botol kultur berisi 5 eksplan megagametofit. Adapun jumlah pengulangan didasarkan pada perhitungan rumus (Zulkarnain, 2009).

$(t-1) (n-1)$	≥ 15	Keterangan : t = Jumlah Perlakuan n = Jumlah pengulangan
$(4-1) (n-1)$	≥ 15	
$(3) (n-1)$	≥ 15	
$3n$	$\geq 15+3$	
$3n$	≥ 18	
n	≥ 6	

Tabel 3.1
Kombinasi Perlakuan (Zat Pengatur Tumbuh dan Eksplan)

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	Eksplan (Megagametofit)	
	Megagametofit Putih	Megagametofit Bening
2,4 D 9 μ M dan BAP 3 μ M	DB93P	DB93B
2,4 D 7 μ M dan BAP 4 μ M	DB74P	DB74B

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah megagametofit yang berwarna putih dan berwarna bening yang diberasal dari strobilus *Pinus merkusii* yang didapatkan dari Perumahan Pondok Hijau Indah dan Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung Utara. Sampel yang digunakan adalah megagametofit yang diambil dari strobilus pohon *Pinus merkusii* yang ditentukan berdasarkan karakter morfologi batang, yaitu batang lurus dengan diameter batang ≥ 25 cm.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur dalam penelitian ini terdiri dari tiga tahap, yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap pengumpulan data.

3.3.1 Tahap Persiapan

3.3.1.1 Sterilisasi Alat dan Persiapan Eksplan

Dalam tahap ini dilakukan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan (Lampiran 1). Sterilisasi basah dengan autoklaf dilakukan untuk alat-alat dan bahan yang akan digunakan untuk penanaman seperti cawan petri, kertas saring, gunting, pinset, scalpel, alumunium foil, gelas kimia, botol kultur, serta aquades disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit (Gambar 3.1). Eksplan (megagametofit) juga dipersiapkan untuk setiap penanamannya. Megagametofit tersebut diperoleh dari hasil koleksi strobilus *Pinus merkusii* yang di dapat dari kawasan Bandung Barat (Gambar 3.2). Strobilus dikoleksi dan digunakan dalam keadaan segar, yang diambil pada bulan Februari 2019. Penentuan pohon yang akan diambil strobilusnya berdasarkan keadaan morfologinya yang memiliki batang lurus dengan diameter batang ≥ 25 cm.



Gambar 3.1 Sterilisasi Alat menggunakan autoklaf



Gambar 3.2 Pengambilan Strobilus *Pinus merkusii*

3.3.1.2 Pembuatan Stok Medium dan ZPT

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Douglas Cotyledon Reserve* (DCR) (Gupta dan Durzan, 1985). Sebelum dilakukan pembuatan medium, terlebih dahulu membuat larutan stok dari bahan yang akan digunakan yang kemudian disimpan dalam refrigator. Pembuatan larutan stok dilakukan dengan pengelompokkan sebagai berikut:

3.3.1.2.1 Stok A = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makronutrien A 50 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 4 gram NH_4NO_3 , dimasukkan kedalam gelas piala berisi akuades kurang lebih 40 ml, sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur. Larutan ini dipindahkan kedalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250 ml, ditutup rapat. Botol diberi label 'stok A'. Penggunaan untuk membuat 1 L medium DCR adalah 5 ml.

3.3.1.2.2 Stok B = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Untuk membuat larutan stok B 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 3,4 gram KNO_3 dan dilarutkan dalam akuades kurang lebih 40 ml menggunakan gelas piala. Pelarutan dilakukan dengan mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah homogen, ditambahkan akuades sampai volume yang diinginkan dalam gelas ukur dan dituangkan

kembali kedalam gelas piala untuk dihomogenkan kembali. Setelah seutuhnya larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250 ml. Botol diberi label 'stok B'. Penggunaan larutan stok B adalah 5 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.3 Larutan stok C = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makroutrien C 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 0,8 gram $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Zat ini dilarutkan dalam akuades hingga 50ml menggunakan gelas piala dan disimpan dalam botol gelap berukuran 250 ml. Botol ditutup rapat dan diberi label 'stok C'. Penggunaan larutan stok C adalah 5 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.4 Larutan stok D = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok makronutrien D untuk 10 kali konsentrasi terdiri dari 3,7 gram MgSO_4 dan 1,7 gram KH_2PO_4 . Kedua makronutrien tersebut dilarutkan dalam 40 ml akuades hingga homogen dan ditambahkan akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur. Larutan dihomogenkan kembali dan disimpan dalam botol gelap. Botol ditutup rapat dan diberi label 'stok D'. Penggunaan untuk 1 L medium DCR adalah 5 ml.

3.3.1.2.5 Larutan stok E = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok E 50 ml untuk 10 kali konsentrasi dibuat dengan melarutkan 5,56 gram $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dalam 40 ml akuades. Larutan dihomogenkan dan ditambahkan akuades hingga 5ml dalam gelas ukur. Setelah homogen, larutan dimasukkan kedalam botol gelap dan ditutup rapat. Botol diberi label 'stok E'. Penggunaan stok E untuk 1 L medium DCR adalah 5 ml.

3.3.1.2.6 Larutan stok zat besi = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok zat besi terdiri dari 0,278 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 0,378 gram NaEDTA untuk 10 L medium DCR. NaEDTA terlebih dahulu dilarutkan dalam 35 ml akuades pada gelas piala diatas *hot plate* dengan suhu kisaran 40-60°C. Setelah homogen larutan dibiarkan kembali pada suhu kamar, kemudian tambahkan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan ditambah akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur. Kedua zat dihomogenkan kemudian dimasukan kedalam botol gelap dan ditutup rapat. Botol

diberi label 'stok zat besi'. Penggunaan stok zat besi untuk 1 L medium DCR adalah 5 ml.

3.3.1.2.7 Larutan stok Mikronutrien F = 100 ml (1000 kali konsentrasi)

Mikronutrien dibuat stok 100 ml untuk 1000 konsentrasi dibuat dengan melarutkan 6,2 gram H_3BO_3 , 8,6 gram $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,38 gram KI, 0,25 gram $NaMoO_4$, 0,25 gram $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, dan 0,025 gram $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ dalam gelas piala berisi akuades 70 ml. Setiap pemasukan bahan, larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur dan dihomogenkan kembali. Larutan disimpan dalam botol gelap berukuran 250 ml, ditutup rapat dan diberi label 'stok F'. Penggunaan larutan F untuk 1 L medium DCR adalah 0,1 ml.

3.3.1.2.8 Larutan stok Mikronutrien G = 100 ml (10.000 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan mikronutrien G 10.000 kali konsentrasi yang dipekatkan menjadi 100 ml dilakukan dengan melarutkan 0,25 gram NiCl dalam 80 ml akuades. Zat dihomogenkan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur dan kembali dihomogenkan sebelum disimpan dalam botol gelap serta ditutup rapat. Botol diberi label 'stok G'. Penggunaan larutan ini adalah 0,01 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.9 Larutan stok Mikronutrien H = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan mikronutrien H 100 kali konsentrasi yang dipekatkan menjadi 100 ml dilakukan dengan melarutkan 2,23 gram $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ dalam 80 ml akuades. Zat dihomogenkan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur dan kembali dihomogenkan sebelum disimpan dalam botol gelap serta ditutup rapat. Botol diberi label 'stok H'. Penggunaan larutan ini adalah 1 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.10 Larutan stok Myo-inositol = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Stok larutan Myo-inositol 50 ml untuk 10 kali konsentrasi dibuat dengan melarutkan Myo-inositol sebanyak 2 gram dalam 40 ml akuades. Larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* diatas *hote plate* dengan suhu berkisar 40-60 °C kemudian ditambah akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur.

Homogenisasi dilakukan kembali sebelum larutan dimasukkan ke dalam botol gelap berukuran 250 ml. Botol ditutup rapat dan diberi label 'stok myo-inositol'. Penggunaan larutan ini adalah 5 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.11 Larutan stok L-Glutamin = 25 ml (5 kali konsentrasi)

Pembuan larutan L-Glutamin 25 ml untuk 5 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 3,65 gram L-Glutamin dalam 20 ml akuades. Zat dihomogenkan diatas *hot plate* dengan suhu sekitar 40-60 °C kemudian ditambah akuades hingga 25 ml dalam gelas ukur dan kembali dihomogenkan sebelum disimpan dalam botol gelap dan ditutup rapat. Botol diberi label 'stok L-Glutamin' dan disimpan dalam refrigerator. Penggunaan larutan ini adalah 5 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.12 Larutan stok Vitamin = 100 ml (1000 kali konsentrasi)

Larutan vitamin terdiri dari 0.5 gram Asam Nikotin, 0,5 Pyridoxin-HCl, 1 gram Thiamin-HCl dan 2 gram L-Glycin. Untuk membuat stok 100 ml dengan 1000 kali kepekatan vitamin terlebih dahulu dilarutkan dalam 70 ml akuades didalam gelas piala, setiap pemasukan bahan, larutan langsung di aduk meggunakan *magnetic stirrer*. Larutan kemudian tambah akuades hingga volume yang diinginkan dan dihomogenkan kembali dalam gelas ukur kemudian disimpan dalam botol gelap. Botol ditutup rapat dan diberi label 'stok vitamin'. Penggunaan stok vitamin adalah 0,1 ml untuk 1 L medium.

3.3.1.2.13 Larutan stok ZPT 2,4 D 7 μ M (100 kali konsentrasi)

Untuk membuat larutan ZPT 2,4 7 μ M 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 0,155 gram 2,4 D dan dilarutkan dalam akuadest kurang lebih 40 ml menggunakan gelas piala. Pelarutan dilakukan dengan meneteskan NaOH 1 N sambil mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah homogen, ditambahkan akuades sampai volume 100 ml. Setelah seutuhnya larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250 ml. Botol diberi label 'stok 2,4 D 7 μ M'. Penggunaan larutan stok 2,4 D 7 μ M adalah 1 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.14 Larutan stok ZPT 2,4 D 9 μ M (100 kali konsentrasi)

Untuk membuat larutan ZPT 2,4 D $9 \mu\text{M}$ 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 0,199 gram 2,4 D dan dilarutkan dalam akuadest kurang lebih 40 ml menggunakan gelas piala. Pelarutan dilakukan dengan meneteskan NaOH 1 N sambil mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah homogen, ditambahkan akuades sampai volume 100 ml. Setelah seutuhnya larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250 ml. Botol diberi label 'stok 2,4 D $9 \mu\text{M}$ '. Penggunaan larutan stok 2,4 D $9 \mu\text{M}$ adalah 1 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.15 Larutan stok ZPT BAP $3 \mu\text{M}$ (100 kali konsentrasi)

Untuk membuat larutan ZPT BAP $3 \mu\text{M}$ 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 0,068 gram BAP dan dilarutkan dalam akuadest kurang lebih 40 ml menggunakan gelas piala. Pelarutan dilakukan dengan meneteskan HCl 1 N sambil mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah homogen, ditambahkan akuades sampai volume 100 ml. Setelah seutuhnya larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250 ml. Botol diberi label 'stok BAP $3 \mu\text{M}$ '. Penggunaan larutan stok BAP $3 \mu\text{M}$ adalah 1 ml untuk 1 L medium DCR.

3.3.1.2.16 Larutan stok ZPT BAP $4 \mu\text{M}$ (100 kali konsentrasi)

Untuk membuat larutan ZPT BAP $4 \mu\text{M}$ 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 0,090 gram BAP dan dilarutkan dalam akuadest kurang lebih 40 ml menggunakan gelas piala. Pelarutan dilakukan dengan meneteskan HCl 1 N sambil mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah homogen, ditambahkan akuades sampai volume 100 ml. Setelah seutuhnya larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250 ml. Botol diberi label 'stok BAP $4 \mu\text{M}$ '. Penggunaan larutan stok BAP $4 \mu\text{M}$ adalah 1 ml untuk 1 L medium DCR.

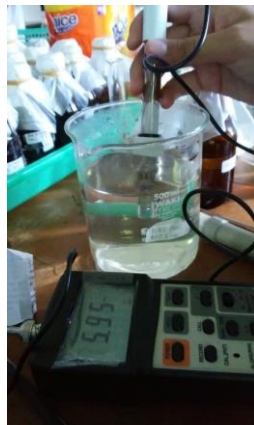
3.3.1.3 Pembuatan Medium

Pembuatan medium pada prinsipnya dilakukan dengan melarutkan semua komponen media dalam air, sesuai dengan konsentrasinya pada formulasi yang diinginkan. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Dougllass Cotyledon Reserve* (DCR), komponen medium DCR tertera dalam

Lampiran 2. Dalam pembuatan medium, terlebih dahulu seluruh larutan stok dipipet dan dicampur dalam *beaker glass* yang telah terlebih dahulu diisi akuades. Setelah tercampur merata, ditambahkan sukrosa 20 g/l kemudian ditambahkan ZPT sesuai dengan kombinasi ZPT yang diinginkan, kemudian medium digenapkan dengan menambahkan akuades hingga mencapai volume yang diinginkan (Gambar 3.3). pH medium dibuat menjadi $5,8 \pm 0,1$ dengan penambahan 1 N NaOH dan atau 1 N HCl (Gambar 3.4). Setelah pH yang diinginkan tercapai, ke dalam larutan medium dimasukkan agar sebanyak 8 g/l. Selanjutnya medium dipanaskan sehingga seluruh agar terlarut, kemudian masing-masing sebanyak 10 ml media dituangkan ke dalam botol kultur (Gambar 3.5). Botol ditutup dengan *aluminium foil*, dan diikat dengan karet, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium kemudian disimpan pada suhu kamar dalam ruangan kultur sampai medium digunakan.



Gambar 3.3 Larutan medium DCR



Gambar 3.4 Pengukuran pH ($5,8 \pm 0,1$)



Gambar 3.5 Pemasukan medium ke dalam botol

3.3.1.4 Sterilisasi *Laminar air flow*

Sebelum dilakukan penanaman pada *Laminar air flow*, perlu dilakukan sterilisasi *Laminar air flow* terlebih dahulu agar terhindar dari kontaminasi mikroorganisme lain, baik jamur maupun bakteri. Sterilisasi *Laminar air flow* dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% terlebih dahulu sebagai desinfektan, kemudian dilanjutkan dengan menyinari *Laminar air flow* tersebut dengan lampu ultraviolet (UV) selama 1 jam. Setelah itu, kemudian lanjut dengan menyalakan *blower* selama 1 jam.

3.3.2 Tahap Pelaksanaan Eksperimen

3.3.2.1 Pengambilan, Pendinginan, Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Strobilus yang dicuplik merupakan strobilus betina yang memiliki warna hijau mengkilat dan memiliki ukuran panjang 5-7 cm (Gambar 3.6). Strobilus dicuci dengan menggunakan detergen dan kemudian disikat dengan menggunakan sikat gigi (Gambar 3.7). Setelah strobilus dicuci, strobilus dimasukkan ke dalam plastik kemudian diberi perlakuan pendinginan dalam refrigerator pada suhu $2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 12 jam. Setelah 12 jam, strobilus dikeluarkan dari refrigerator kemudian biji dikeluarkan dari strobilus dan diberi perlakuan pendinginan kembali dalam refrigerator pada suhu $2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 12 jam. Teknik pendinginan dilakukan sebagai *pretreatment* dalam rangka mengakumulasi amilum dalam biji (Salisbury dan Ross, 1984), giberelin dan sitokinin, permeabilitas membran juga meningkat dengan perlakuan pendinginan, hal ini memudahkan distribusi air antar sel (Devlin & Witham, 1983).



Gambar 3.6 Strobilus *Pinus merkusii* berukuran 5-7 cm



Gambar 3.7 Strobilus *Pinus merkusii* disterilisasi dengan detergen

Biji *Pinus merkusii* dikeluarkan dari refigerator lalu dilakukan sterilisasi ekplan di dalam *laminar air flow*. Biji dicuci dengan menggunakan bayclin 40% selama 15 menit, kemudian dibilas dengan menggunakan aquadest steril selama 3 kali, masing-masing 3 menit (Gambar 3.8). Biji yang telah steril ditempatkan di atas cawan petri yang dilapisi kertas saring. Kulit luar biji dikupas dan megagametofitnya dikeluarkan. Megagametofit yang telah dikeluarkan dari kulit bijinya lalu ditanam pada botol kultur yang berisikan medium steril (Gambar 3.9).

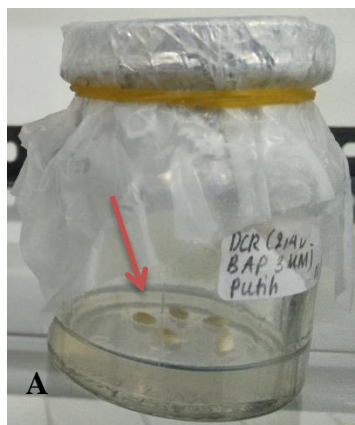
Eksplan ditanam dalam keadaan steril dan aseptik pada *laminar air flow*. Eksplan megagametofit yang berwarna bening dan berwarna putih yang telah mendapat perlakuan dingin ditanam dalam medium DCR dengan kombinasi ZPT yaitu 2,4-D dan BAP dengan konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 2,4 D 7 μM dan BAP 4 μM (DB74) dan 2,4 D 9 μM dan BAP 3 μM (DB93). Masing-masing dalam botol ditanam lima eksplan megagametofit (Gambar 3.10).



Gambar 3.8 Eksplan disterilisasi menggunakan bayclin 40%



Gambar 3.9 Megagametofit ditanam dalam medium steril



Gambar 3.10 (A) Megagametofit putih yang ditanam pada medium DCR (1,3x)
(B) Megagametofit bening yang ditanam pada medium DCR (1,3x);
Ket: → (megagametofit yang ditanam pada medium DCR)

3.3.2.2 Tahapan Induksi

Eksplan megagametofit yang telah ditanam pada media tanam kemudian dilakukan induksi dengan menginkubasi botol kultur yang berisi eksplan megagametofit (warna bening dan warna putih) dalam ruangan tanpa cahaya pada suhu kamar dan diamati setiap satu minggu satu kali selama 3 bulan. Indikator keberhasilan induksi embrio somatik yaitu ditandai dengan munculnya suspensor dari ujung mikropil megagametofit (Lelu-Walter *et al.*, 1999).

3.3.2.3 Tahapan Proliferasi

Tahap proliferasi merupakan tahapan lanjutan dari proses induksi. Tahap proliferasi dilakukan sama halnya dengan tahapan induksi, yaitu dilakukan dalam ruangan tanpa cahaya, dengan perlakuan dan medium yang sama. Indikator keberhasilan tahap proliferasi ditandai dengan perkembangan pada juluran berwarna putih seperti benang menjadi kultur embriogenik yang berwarna putih bening atau transparan, mucilaginous, licin, dan terdapat banyak embrio somatik yang disebut *embryo suspensor mass* (ESM) (Grossnickle *et al.*, 1991).

3.3.2.4 Subkultur Kultur Embriogenik

Kultur embrio somatik yang telah berproliferasi dan menghasilkan kultur embriogenik dalam jumlah yang banyak, disubkultur atau dengan kata lain dipindahkan ke medium baru yang sama dengan medium induksi. Proses subkultur dilakukan dengan memotong bagian massa embrio somatik (ESM) yang telah banyak, dilakukan di dalam *laminar air flow* yang telah disterilisasi dengan kondisi aseptik.

3.3.3 Tahap Pengumpulan dan Analisis Data

Embrio somatik yang berhasil diinduksi dari setiap kombinasi ZPT dihitung persentasenya dari tiap ulangan, kemudian dihitung rata-rata persentasenya untuk enam ulangan. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Nurdini (2005), tiap embrio somatik yang terinduksi dari satu biji dihitung sebagai 20% dari total lima biji dalam satu botol. Perhitungannya sebagai berikut:

$$\% \text{ Induksi} = \frac{\text{Jumlah megagametofit yang mengalami induksi ES}}{\text{Jumlah megagametofit dalam botol}} \times 100\%$$

Perhitungan ini juga berlaku untuk respon *in vitro* lain yang terjadi.

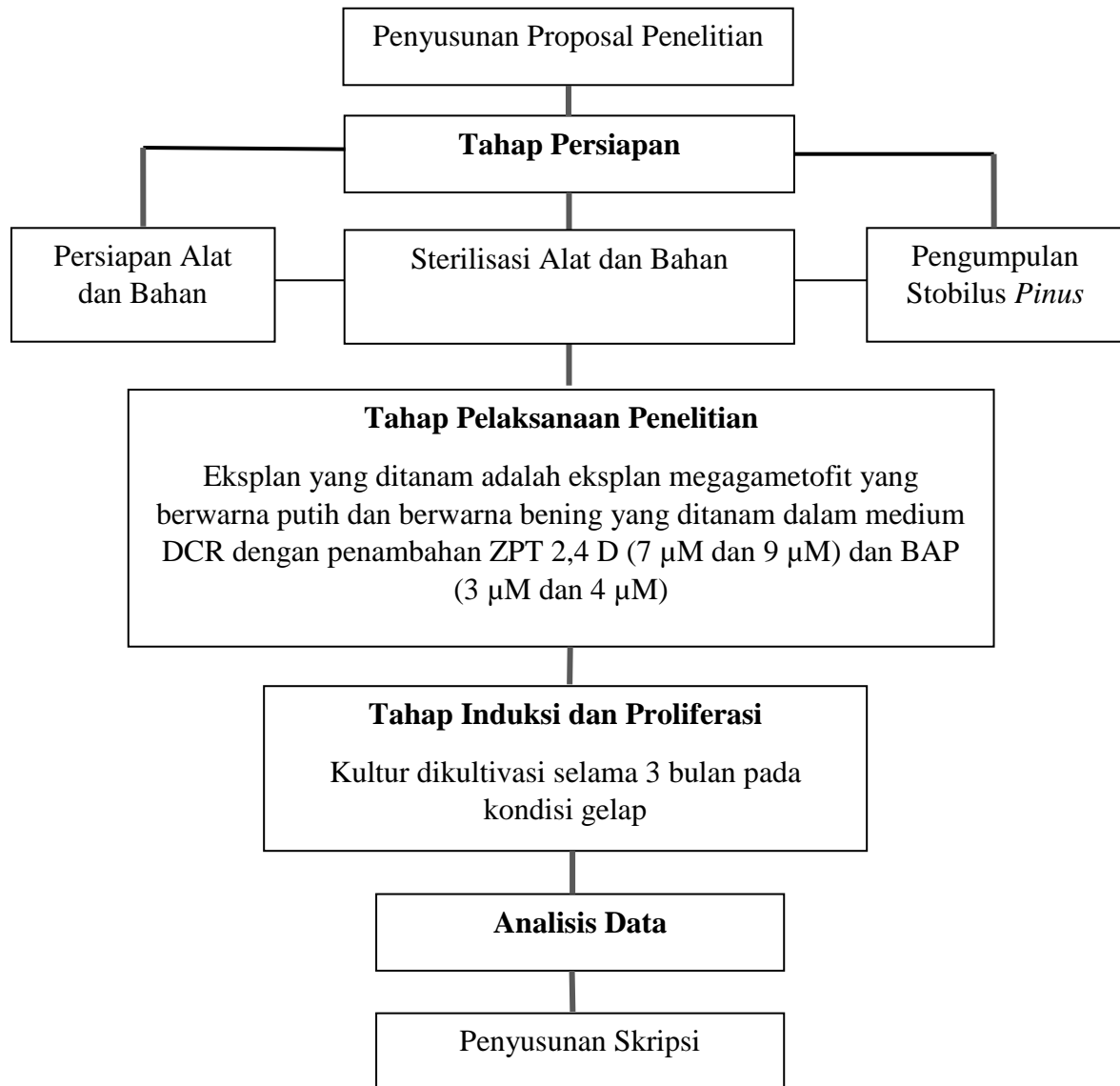
Embrio somatik yang berproliferasi juga dihitung persentase proliferasinya.

Perhitungannya sebagai berikut:

$$\% \text{ Proliferasi} = \frac{\text{Jumlah megagametofit yang mengalami proliferasi ES}}{\text{Jumlah megagametofit dalam botol}} \times 100\%$$

3.3.4 Alur Penelitian

Bagan alur penelitian (Gambar 3.11) adalah sebagai berikut:



Gambar 3.11 Alur Penelitian