

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan jenis penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif (*descriptive research*) adalah suatu metode penelitian yang ditujukan untuk menggambarkan fenomena-fenomena yang ada, yang berlangsung pada saat ini atau saat yang lampau. Menurut Furchan (2004), penelitian deskriptif mempunyai karakteristik sebagai berikut:

- 3.1.1 Penelitian deskriptif cenderung menggambarkan suatu fenomena apa adanya dengan cara menelaah secara teratur-ketat, mengutamakan obyektivitas, dan dilakukan secara cermat
- 3.1.2 Tidak adanya perlakuan yang diberikan atau dikendalikan, dan tidak adanya uji *h*.

Menurut Kountur (2003), penelitian deskriptif mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

- 3.1.1 Berhubungan dengan keadaan yang terjadi saat itu
- 3.1.2 Menguraikan satu variabel saja atau beberapa variabel namun diuraikan satu persatu
- 3.1.3 Variabel yang diteliti tidak dimanipulasi atau tidak ada perlakuan (*treatment*).

Penelitian deskriptif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keberadaan suatu variabel (Sugiyono, 2015). Penelitian ini dilakukan dengan menanam eksplan megagametofit *Pinus merkusii* pada medium *Douglas Cotyledon Reserve* (DCR) yang mengandung kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) berupa 2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) dan 6-*furfuryl amino purine* (kinetin) pada beberapa konsentrasi. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan adalah 0 μM , 7 μM , 9 μM , dan 11 μM , sedangkan konsentrasi kinetin yang digunakan adalah 0 μM , 2 μM , 3 μM , dan 4 μM . Penggunaan konsentrasi ZPT yang digunakan

Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rahmadani (2007). Data yang diambil dalam penelitian ini meliputi data kuantitatif dan kualitatif respons eksplan megagametofit yang ditaman pada medium DCR dengan kombinasi 2,4-D dan kinetin sebagaimana yang tercantum pada Tabel 3.1.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2017 hingga Juli 2018. Pengambilan sampel penelitian dilakukan di kawasan Pondok Hijau, Bandung Utara. Penanaman dan pengamatan eksplan dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Botani, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA), Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian (Lampiran 1) merupakan alat dan bahan yang terdapat di Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Botani, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA), Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).

Tabel 3.1
Kombinasi konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Kinetin 2,4-D	0 μ M	2 μ M	3 μ M	4 μ M
0 μ M	DK00 (2,4-D 0 μ M; kinetin 0 μ M)	DK02 (2,4-D 0 μ M; kinetin 2 μ M)	DK03 (2,4-D 0 μ M; kinetin 3 μ M)	DK04 (2,4-D 0 μ M; kinetin 4 μ M)

Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu
| perpustakaan.upi.edu

7 μM	DK70 (2,4-D 7 μM ; kinetin 0 μM)	DK72 (2,4-D 7 μM ; kinetin 2 μM)	DK73 (2,4-D 7 μM ; kinetin 3 μM)	DK74 (2,4-D 7 μM ; kinetin 4 μM)
9 μM	DK90 (2,4-D 9 μM ; kinetin 0 μM)	DK92 (2,4-D 9 μM ; kinetin 2 μM)	DK93 (2,4-D 9 μM ; kinetin 3 μM)	DK94 (2,4-D 9 μM ; kinetin 4 μM)
11 μM	DK110 (2,4-D 11 μM ; kinetin 0 μM)	DK112 (2,4-D 11 μM ; kinetin 2 μM)	DK113 (2,4-D 11 μM ; kinetin 3 μM)	DK114 (2,4-D 11 μM ; kinetin 4 μM)

Keterangan: Kode menunjukkan kombinasi ZPT

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Alat dan Bahan

Pada tahap ini dilakukan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Sterilisasi basah menggunakan autoklaf dilakukan untuk alat-alat penanaman seperti scalpel, gunting, pinset, gelas piala, cawan petri, kertas saring, dan aluminium foil serta akuades steril untuk pencucian dan pembilasan eksplan. Alat logam dan kaca dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas sebelum disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Alat-alat penanaman kemudian disimpan di ruang kultur pada suhu kamar. Sterilisasi juga dilakukan pada *Laminar air flow* (LAF). *Laminar air flow* (LAF) dipersiapkan untuk setiap penanaman eksplan dengan dibersihkan terlebih dahulu permukaannya menggunakan alkohol 70%, disinari menggunakan sinar *ultra violet* (UV) dan *diblower* untuk menyaring udara yang ada di dalam laminar selama masing-masing satu jam.

3.4.2 Pembuatan Medium

Afni Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu
| perpustakaan.upi.edu

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Douglas Cotyledon Reverse* (DCR) (Tabel 3.2). Dalam pembuatan medium, terlebih dahulu dilakukan pembuatan larutan stok dengan mengelompokkan komponen penyusun medium berdasarkan sifat dan kelarutannya antara lain: stok makronutrien, mikronutrien, vitamin (asam nikotin, pyridoxin-HCl, thiamin-HCl), asam amino (L-glutamin dan L-glycin), myo-inositol, dan larutan stok zat pengatur tumbuh (ZPT). Berikut pembagian dan pembuatan masing-masing kelompok larutan stok tersebut di atas:

3.4.2.1 Larutan stok makronutrien A (NH_4NO_3) = 50 mL (10 kali konsentrasi)

Larutan stok makronutrien A dibuat sebanyak 50 mL untuk 10 kali konsentrasi. Pembuatannya dilakukan dengan menimbang sebanyak 4 gram NH_4NO_3 , dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 30 mL, dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 5 mL larutan stok A untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.2 Larutan stok maktonutrien B (KNO_3) = 50 mL (10 kali konsentrasi)

Sebanyak 3,4 gram KNO_3 ditimbang, dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 30 mL, dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label.

Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

Dibutuhkan larutan stok B sebanyak 5 mL untuk pembuatan 1 L medium DCR.

Tabel 3.2
Komposisi medium *Douglas Cotyledon Reserve* (DCR)
(Gupta dan Durzan, 1985)

No.	Bahan kimia	Jumlah dalam 1 L (mg)
1.	NH_4NO_3	400
2.	KNO_3	340
3.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	85
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
5.	KH_2PO_4	170
6.	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556
7.	KI	0,83
8.	H_3BO_3	6,2
9.	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
10.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
11.	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
12.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
13.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
14.	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
15.	Na_2EDTA	37,8
16.	NiCl_2	0,025
17.	Thiamin-HCl	1,0
18.	Asam Nikotin	0,5
19.	Pyridoxin-HCl	0,5
20.	Myo-inositol	200
21.	L-Glycin	2,0
22.	L-Glutamin	730

Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

3.4.2.3 Larutan stok makronutrien C ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) = 50 mL (10 kali konsentrasi)

Sebanyak 0,85 gram $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ditimbang, dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 30 mL, dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Ke dalam gelas ukur ditambahkan akuades hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 5 mL larutan stok C untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.4 Larutan stok makronutrien D (MgSO_4 dan KH_2PO_4) = 50 mL (10 kali konsentrasi)

Larutan stok makronutrien D terdiri dari MgSO_4 sebanyak 3,7 gram dan KH_2PO_4 sebanyak 1,7 gram. Keduanya dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 30 mL, dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Ke dalam gelas ukur ditambahkan akuades hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 5 mL larutan stok D untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.5 Larutan stok makronutrien E ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) = 50 mL (10 kali konsentrasi)

Sebanyak 5,56 gram $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ditimbang, dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 30 mL, dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan

Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN

KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 5 mL larutan stok E untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.6 Larutan stok zat besi (NaEDTA dan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 50 mL (10 kali konsentrasi)

Pembuatan 50 mL larutan stok zat besi untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,378 gram NaEDTA dan 0,278 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Kedua bahan ini dilarutkan secara terpisah. NaEDTA terlebih dahulu dilarutkan dalam gelas piala berisi kurang lebih 15 mL akuades dengan dipanaskan di atas *hot plate* pada suhu kurang lebih 40-60°C hingga larut selama beberapa menit. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan ke dalam gelas piala yang berisi larutan NaEDTA dan diaduk hingga tercampur merata menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan yang telah tercampur dibiarkan hingga suhunya kurang lebih 25°C (suhu kamar). Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 5 mL larutan stok zat besi untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.7 Larutan stok mikronutrien F = 100 mL (1000 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok mikronutrien F 1000 kali konsentrasi yang dipekatkan menjadi 100 mL dilakukan dengan menimbang sebanyak 6,2 gram H_3BO_3 , 8,6 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22,3 gram $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,83 gram KI, 0,25 gram NaMoO_4 , 0,25 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan 0,025 gram $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Bahan dimasukkan satu per satu ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 70 mL. Setiap pemasukan bahan diikuti dengan pengadukan menggunakan **Afini Zulafa Nabila, 2018**

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

magnetic stirrer hingga larut, baru ditambahkan oleh bahan berikutnya. Larutan yang telah tercampur merata dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 20 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 100 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 0,1 mL larutan stok mikronutrien F untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.8 Larutan stok mikronutrien G (NiCl) = 100 mL (10.000 kali konsentrasi)

Sebanyak 0,25 gram NiCl ditimbang, dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 70 mL, dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 20 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 100 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 0,01 mL larutan stok mikronutrien G untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.9 Larutan stok myo-inositol = 50 mL (10 kali konsentrasi)

Sebanyak 2 gram myo-inositol ditimbang, dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 30 mL. Larutan dipanaskan pada suhu kurang lebih 40-60°C hingga larut selama beberapa menit. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 5 mL larutan stok myo-inositol untuk pembuatan 1 L medium DCR.

Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

3.4.2.10 Larutan stok vitamin dan asam amino (L-glycin) = 100 mL (1000 kali konsentrasi)

Sebanyak 0,5 gram asam nikotin, 0,5 gram pyridoxin-HCl, 1 gram thiamin-HCl, dan 2 gram L-glycin ditimbang, dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 70 mL, dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 20 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 100 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan larutan stok vitamin dan asam amino (L-glycin) sebanyak 0,1 mL untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.11 Larutan stok asam amino (L-glutamin) = 50 mL (10 kali konsentrasi)

Sebanyak 7,3 gram L-glutamin ditimbang, dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 30 mL. Larutan dipanaskan di atas *hot plate* pada suhu kurang lebih 40-60°C hingga larut selama beberapa menit. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan sebanyak 5 mL larutan stok asam amino (L-glutamin) untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.12 Larutan stok ZPT 2,4-D = 50 mL (100 kali konsentrasi)

Larutan stok ZPT 2,4-D dibuat dengan tiga konsentrasi yang berbeda, yaitu 7, 9, dan 11 μM . Larutan stok ZPT 2,4-D masing-masing dibuat untuk 100 kali konsentrasi medium. Sebanyak 0,155 gram 2,4-D untuk konsentrasi 7 μM , 0,199 gram 2,4-D untuk konsentrasi 9 μM , dan 0,234 gram 2,4-D untuk konsentrasi 11 μM ditimbang. Masing-masing bahan dilarutkan dengan cara diteteskan 2 - 5 tetes larutan NaOH 1 N

Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

dengan hati-hati hingga bahan benar-benar larut. Bahan dituangkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 20 mL dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Masing-masing larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan larutan stok ZPT 2,4-D sebanyak 0,5 mL sesuai dengan konsentrasi ZPT 2,4-D yang diinginkan untuk pembuatan 1 L medium DCR.

3.4.2.13 Larutan stok ZPT Kinetin = 50 mL (100 kali konsentrasi)

Larutan stok ZPT kinetin dibuat dengan tiga konsentrasi yang berbeda, yaitu 2, 3, dan 4 μM . Larutan stok ZPT kinetin masing-masing dibuat untuk 100 kali konsentrasi medium. Sebanyak 0,043 gram kinetin untuk konsentrasi 2 μM , 0,064 gram kinetin untuk konsentrasi 3 μM , dan 0,086 gram kinetin untuk konsentrasi 4 μM ditimbang. Masing-masing timbangan bahan dilarutkan dengan diteteskan 2 – 5 tetes larutan HCl 1 N dengan hati-hati hingga bahan benar-benar larut. Bahan dituangkan ke dalam gelas piala berisi akuades dengan volume kurang lebih 20 mL dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Masing-masing larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL. Gelas piala dibilas dengan akuades (kurang lebih sebanyak 10 mL) dan air bilasan dituang ke dalam gelas ukur tersebut. Akuades ditambahkan ke dalam gelas ukur hingga volume larutan tepat mencapai 50 mL. Larutan dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup rapat, dan diberi label. Dibutuhkan larutan stok ZPT kinetin sebanyak 0,5 mL sesuai dengan konsentrasi ZPT kinetin yang diinginkan untuk pembuatan 1 L medium DCR.

Pembuatan 1 L medium untuk 16 kombinasi ZPT 2,4-D dan kinetin dilakukan dengan masing-masing larutan stok diambil menggunakan pipet sesuai kebutuhan dan dimasukkan ke dalam gelas

Afni Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

piala berukuran 1 L yang telah berisi akuades kurang lebih 100 mL. Sebanyak 20 gram sukrosa ditambahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga tercampur merata. Akuades ditambahkan hingga volume larutan tepat mencapai 500 mL. Larutan medium dituangkan ke dalam 16 gelas piala berukuran 50 mL masing-masing sebanyak 15 mL dan ditambahkan larutan stok ZPT sesuai dengan kombinasi yang diinginkan. Akuades ditambahkan ke dalam setiap gelas piala hingga volumenya kurang lebih 25 mL. pH medium diatur menjadi $5,8 \pm 0,1$ dengan menambahkan 0,1 N NaOH dan atau 0,1 N HCl. Setelah pH yang diinginkan tercapai, pada setiap gelas piala berukuran 50 mL tadi ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 30 mL. Agar-agar sebanyak 0,24 gram dimasukkan dan larutan dipanaskan hingga agar-agar larut. Setelah agar-agar benar-benar larut, sebanyak 10 mL medium kemudian dituang ke dalam botol-botol kultur yang sebelumnya telah disterilisasi. Botol-botol ini kemudian ditutup dengan aluminium foil dan diikat dengan karet. Botol kultur berisi medium kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah sterilisasi, botol kultur berisi medium disimpan di ruang kultur pada suhu kamar.

3.4.3 Persiapan Eksplan

Eksplan (megagametofit) dipersiapkan untuk setiap penanamannya. Megagametofit tersebut diperoleh dari hasil koleksi strobilus *Pinus merkusii* yang terdapat di kawasan Pondok Hijau, Bandung Utara. Strobilus dikoleksi dan digunakan dalam keadaan segar, yang diambil pada bulan Mei sampai Juni 2018. Penentuan pohon yang akan diambil strobilusnya berdasarkan banyak tidaknya strobilus muda. Strobilus betina yang telah diambil dan dikumpulkan kemudian dicuci dan disikat menggunakan sikat gigi dan detergen, dibungkus dengan plastik, dan diberi perlakuan pendinginan dalam *refrigerator* pada suhu $2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama minimal 12 jam sebelum penanaman.

Afini Zulafa Nabila, 2018

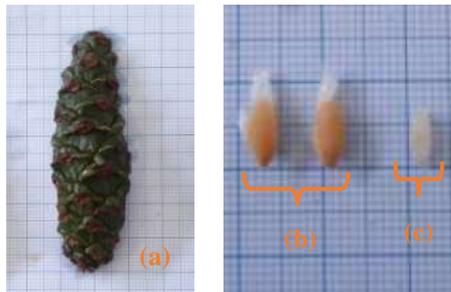
RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

3.4.4 Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Biji dikeluarkan dari strobilus yang telah diberikan perlakuan pendinginan selama minimal 12 jam dalam *refrigerator* pada suhu $2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Biji disterilisasi permukaannya menggunakan Bayclin 40% (40 ml bayclin dalam 60 ml akuades) selama 15 menit, lalu dibilas tiga kali dengan akuades steril masing-masing selama 3 menit. Eksplan berupa megagametofit kemudian dikeluarkan dari biji yang telah disteriliasi dan ditanam pada botol kultur. Setiap botol kultur berisi 3 buah megagametofit. Tahap sterilisasi biji sampai dengan penanaman eksplan dilakukan dalam kondisi steril dan aseptik di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) (Gambar 3.1).



Gambar 3. 1 Strobilus betina (a); biji (b); dan megagametofit *Pinus merkusii* (c) (Dokumentasi Pribadi, 2018)

3.4.5 Pengumpulan dan Analisis Data

Botol kultur yang telah berisi megagametofit disimpan dalam keadaan gelap pada suhu kamar dan diamati setiap satu minggu sekali selama 8 minggu. Tiap respons yang terjadi seperti pembesaran jaringan megagametofit, pembentukan kalus, perkecambahan, dan pembentukan embrio somatik didokumentasikan serta dihitung persentasenya dari setiap kombinasi ZPT dan tiap ulangan, kemudian dihitung rata-rata

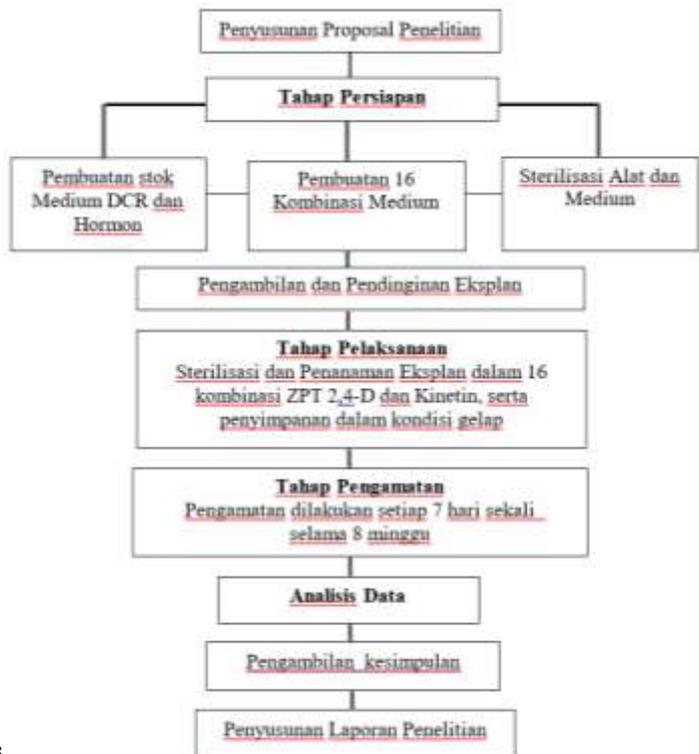
Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA
 Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu
 | perpustakaan.upi.edu

persentasenya untuk tiga ulangan. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Nurdini (2005), jumlah biji dalam botol dihitung sebagai 100%. Persentase respons kemudian dihitung dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Presentase respons} = \frac{\text{Jumlah biji mengalami respons tertentu}}{\text{Jumlah biji dalam satu botol}} \times 100\%$$

3.5 Alur Penelitian



Afi

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA
 Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu
 | perpustakaan.upi.edu

Gambar 3. 1 Alur Penelitian (Dokumentasi Pribadi, 2018)

Afini Zulafa Nabila, 2018

RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. YANG DIKULTUR PADA MEDIUM DCR DENGAN KOMBINASI 2,4-D DAN KINETIN YANG BERBEDA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu