

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai dengan bulan Juni 2012.

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah eksplan berupa tunas tin diperoleh dari Tangerang, BAP, NAA, GA₃, Bakterisida (Agrept), Fungisida (Delsene-MX-80-wp), larutan NaClO 5% dan 10%, akuades steril, alkohol 70%, medium MS, deterjen cair, betadin dan vitamin C.

2. Alat

Alat yang digunakan terdiri dari: Peralatan gelas (Botol kultur, cawan petri, gelas ukur, gelas beaker, erlenmeyer), pH meter, *aluminium foil*, plastik wrap, timbangan analitik, skalpel, pinset, autoklaf, *Laminar air flow* (LAF), *magnetic stirrer*, sprayer, rak kultur, kompor gas, lampu bunsen, sendok, mistar, alat tulis, pipet dan *Munsel Plant Tissue colour Chart*.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua tahap percobaan yaitu optimasi sterilisasi dan induksi tunas pada medium MS-GA₃ dengan penambahan BAP dan NAA.

1. Tahap Optimasi Sterilisasi

Penelitian ini disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan percobaan faktor tunggal sebanyak 5 perlakuan, yaitu:

Perlakuan	Step 1		Step 2		Step 3		Step 4		Step 5		Step 6	
	Sterilan	Waktu	Sterilan	Waktu	Sterilan	Waktu	Sterilan	Waktu	Sterilan	Waktu	Sterilan	Jumlah
A	NaClO 1% + deterjen cair 2 tetes	5 menit	Fungisida 4g/L+ Bakterisida 4 g/L	5 menit	Alkohol 70%	30 detik	NaClO 0,1%	7 menit	Vitamin C 0,1 %	4-5 kali	Betadine	5 tetes
B	NaClO 1% + deterjen cair 2 tetes	5 menit	Fungisida 4g/L+ Bakterisida 4 g/L	30 menit	Alkohol 70%	30 detik	NaClO 0,1%	7 menit	Vitamin C 0,1 %	4-5 kali	Betadine	5 tetes
C	NaClO 10% + deterjen cair 2 tetes	5 menit	Fungisida 4g/L+ Bakterisida 4 g/L	1 jam	Alkohol 70%	30 detik	NaClO 5%	7 menit	Vitamin C 0,1 %	4-5 kali	Betadine	5 tetes
D	NaClO 10% + deterjen cair 2 tetes	5 menit	Fungisida 4g/L+ Bakterisida 4 g/L	2 jam	Alkohol 70%	30 detik	NaClO 5%	7 menit	Vitamin C 0,1 %	4-5 kali	Betadine	5 tetes
E	NaClO 10% + deterjen cair 2 tetes	5 menit	Fungisida 4g/L+ Bakterisida 4 g/L	3 jam	Alkohol 70%	30 detik	NaClO 5%	7 menit	Vitamin C 0,1 %	4-5 kali	Betadine	5 tetes

Eksplan dipotong dan dicuci air mengalir selama 10 menit sebelum diberikan perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 ulangan sehingga total ada 15 unit percobaan.

Tujuan penelitian tahap I adalah untuk mendapatkan metode sterilisasi yang paling baik untuk kultur tunas tin. Perlakuan sterilisasi dengan hasil terbaik kemudian digunakan sebagai metode sterilisasi eksplan pada penelitian induksi tunas tin.

2. Tahap Induksi Tunas Tin

Penelitian ini berupa percobaan laboratorium di Laboratorium Kultur *In vitro*. Rancangan percobaan ini adalah faktor tunggal dengan 7 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 6 kali.

Perlakuan yang dicobakan adalah:

A = Medium MS + BAP 0 mg/L + NAA 0 mg/L + GA₃ 0,5 mg/L (Kontrol)

B = Medium MS + BAP 2 mg/L + NAA 0,5 mg/L + GA₃ 0,5 mg/L

C = Medium MS + BAP 4 mg/L + NAA 0,5 mg/L + GA₃ 0,5 mg/L

D = Medium MS + BAP 6 mg/L + NAA 0,5 mg/L + GA₃ 0,5 mg/L

E = Medium MS + BAP 2 mg/L + NAA 1 mg/L + GA₃ 0,5 mg/L

F = Medium MS + BAP 4 mg/L + NAA 1 mg/L + GA₃ 0,5 mg/L

G = Medium MS + BAP 6 mg/L + NAA 1 mg/L + GA₃ 0,5 mg/L

Jumlah total unit percobaan adalah $7 \times 6 = 42$ unit percobaan.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan dua metode yaitu metode sterilisasi basah dan bakar. Sterilisasi basah dilakukan untuk botol kultur, gelas piala, cawan petri, erlenmeyer, pinset, dan pipet. Alat-alat tersebut dibungkus dengan kertas payung kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Sterilisasi bakar dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) sebelum proses penanaman dengan memasukkan alat (skalpel, gunting, pinset) ke dalam alkohol 70% kemudian dibakar di atas lampu bunsen.

2. Pembuatan Medium MS

Eksplan yang sudah disterilkan kemudian ditanam pada botol kultur yang berisi medium MS yang mengandung nutrisi dan ZPT untuk pertumbuhan eksplan. Cara pembuatan medium MS yang sesuai dengan komposisi Murashige dan Skoog (1962) adalah:

a. Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok terlebih dahulu dibuat untuk mempermudah dalam pembuatan medium MS. Pembuatan larutan stok bertujuan meniadakan penimbangan kembali setiap membuat medium dan menghindari kesalahan penimbangan jika bahan yang ditimbang sedikit. Pembuatan larutan stok medium MS dilakukan dengan cara sebagai berikut:

i. Stok A (10 x konsentrasi)

Larutan stok A dibuat dengan cara menimbang NH_4NO_3 sebanyak 16,5 g, kemudian dilarutkan dalam akuades steril sebanyak 25 ml menggunakan gelas beaker, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Setelah larut kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur dan volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok A dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label A 10 ml/L dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 10 ml stok A.

ii. Stok B (10 x konsentrasi)

Larutan stok B dibuat dengan cara menimbang KNO_3 sebanyak 19 g, kemudian dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 25 ml dalam gelas beaker dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Setelah larut kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur dan volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok B dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label B 10 ml/L dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 10 ml stok B.

iii. Stok C (10 x konsentrasi)

Larutan stok C dibuat dengan cara menimbang KHPO_4 sebanyak 1,7 g, H_3BO_3 0,062 g, Na_2MoO_4 0,0025 g, dan KI sebanyak 0,0083 g. Semua bahan dilarutkan dengan akuades steril sampai homogen. Setelah larut kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur dan volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok C dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label C 10 ml/L dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 10 ml stok C.

iv. Stok D (10 x konsentrasi)

Larutan stok D dibuat dengan cara menimbang $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 4,4 g, kemudian dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 25 ml dalam gelas beaker hingga homogen. Setelah larut kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur dan volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok D dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label D 10 ml/L dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 10 ml stok D.

v. Stok E (10 x konsentrasi)

Larutan stok E dibuat dengan cara menimbang $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 3,7 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,223 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

sebanyak 0,086 g. Semua bahan kemudian dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 25 ml dalam gelas beaker dan diaduk hingga homogen. Setelah larut kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur dan volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok E dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label E 10 ml/L dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 10 ml stok E.

vi. Stok F (10 x konsentrasi)

Larutan stok F dibuat dengan cara menimbang $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,278 g, dan NaEDTA sebanyak 0,373 g, kemudian dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 25 ml dalam gelas beaker dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Setelah larut kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur dan volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok F dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label F 10 ml/L dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 10 ml stok F.

vii. Stok Co dan Cu (100 x konsentrasi)

Larutan stok Co dan Cu dibuat dengan cara menimbang $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,0025 g, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,0025 g. Semua bahan kemudian dilarutkan dengan akuades steril

sebanyak 25 ml dalam gelas beaker dan diaduk hingga homogen. Setelah larut kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur dan volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok Cu dan Co dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label Cu dan Co 1 ml/L dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 1 ml stok Cu dan Co.

viii. Stok Vitamin (10 x konsentrasi)

Larutan stok vitamin dibuat dengan cara menimbang *pyridoxine HCl* sebanyak 0,005 g, *Thiamine HCl* sebanyak 0,001 g *Nicotine acid* sebanyak 0,005 g, dan *glycine* sebanyak 0,02 g. Semua bahan kemudian dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 25 ml dalam gelas beaker dan diaduk hingga homogen. Setelah larut kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur dan volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok vitamin dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label vitamin 10 ml/L dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 10 ml stok vitamin.

ix. Stok BAP (100 ppm)

Larutan stok BAP dibuat dengan cara menimbang BAP sebanyak 10 mg kemudian ditetesi HCl dan diaduk sampai larut, setelah itu volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades

steril, kemudian larutan stok BAP dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label BAP 100 ppm dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS dengan penambahan 1 ppm BAP diperlukan 10 ml stok BAP.

x. Stok NAA (100 ppm)

Larutan stok NAA dibuat dengan cara menimbang NAA sebanyak 10 mg kemudian ditetesi NaOH dan diaduk sampai larut, setelah itu volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok NAA dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label NAA 100 ppm dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS dengan penambahan 1 ppm NAA diperlukan 10 ml stok NAA.

xi. Stok GA₃ (100 ppm)

Larutan stok GA₃ dibuat dengan cara menimbang GA₃ sebanyak 10 mg kemudian diaduk sampai larut, setelah itu volume ditepatkan hingga 100 ml dengan menambahkan akuades steril, kemudian larutan stok GA₃ dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label GA₃ 100 ppm dan disimpan dalam *refrigerator*. Untuk membuat 1 liter medium MS dengan penambahan 1 ppm GA₃ diperlukan 10 ml stok GA₃.

xii. Mio-inositol 100 mg/L, sukrosa 20 g/L dan agar 7g/L diberikan pada saat pembuatan medium.

b. Proses Pembuatan Medium MS

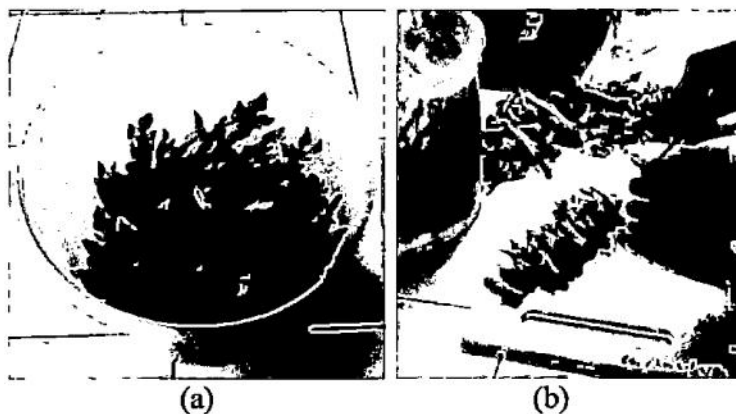
Medium MS yang diperlukan untuk 70 botol dan tiap botol berisi 20 ml medium adalah $70 \times 20 \text{ ml} = 1400 \text{ ml}$ untuk 7 perlakuan, sehingga volume tiap perlakuan adalah 200 ml.

Medium MS sebanyak 200 ml dibuat dengan mencampurkan larutan stok antara lain: larutan stok A 2 ml, stok B 2 ml, stok C 2 ml, stok D 2 ml, stok E 2 ml, stok F 2 ml, larutan mikro Cu 0,2 ml, larutan mikro Co 0,2 ml, stok vitamin 2 ml, mio-inositol 20 mg dan sukrosa 4 g. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer yang telah diisi akuades sebanyak 100 ml, kemudian diaduk sampai homogen. Setelah itu ditambahkan BAP dan NAA serta GA₃ sesuai dengan perlakuan. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH larutan medium, jika pH medium kurang dari 6 maka ditambahkan KOH dan jika lebih dari 6 maka ditambahkan HCl. Bahan yang terakhir dimasukkan adalah pematat agar sebanyak 1,4 g, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen dan ditambahkan akuades hingga volume 200 ml. Larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik dan diikat karet. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰ C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Setelah selesai medium disimpan sementara di ruang inkubasi.

3. Penanaman

a. Persiapan eksplan

Eksplan yang ditanam adalah eksplan yang telah diseleksi dan diambil dari tanaman induk yang sehat. Bagian tanaman yang digunakan adalah bagian tunas pucuk dari nodus yang dipotong dengan ukuran 1,5 cm.



Gambar 1. Eksplan Tin, a) Bahan Eksplan dari Induk, b) Eksplan dengan ukuran 1,5 cm

b. Sterilisasi eksplan

Sterilisasi eksplan menggunakan 5 metode yang berbeda sesuai dengan perlakuan yang dilakukan secara bertahap. Eksplan dicuci dengan air mengalir selama 10 menit, kemudian dicelupkan dalam *sodium hypochlorite* (NaClO) sesuai perlakuan yang ditetesi 2 tetes deterjen cair, selanjutnya dicuci dengan akuades steril 3-4 kali, dilanjutkan dengan perendaman fungisida dan bakterisida 4g/L dan lama perendaman disesuaikan dengan perlakuan, kemudian dicuci dengan akuades steril 3-4 kali, eksplan kemudian direndam dalam larutan alkohol 70% selama 30 detik, dan disterilisasi dengan NaClO dengan kadar dan lama

perendaman sesuai dengan perlakuan yang dilanjutkan dengan membilas dengan akuades 3-4 kali. Sterilisasi eksplan berikutnya dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* yaitu dengan cara merendam eksplan dalam larutan NaClO sesuai perlakuan, kemudian dicuci dengan akuades 3-4 kali selanjutnya dibilas dengan larutan anti oksidan steril (*L-ascorbic acid*) sebanyak 4-5 kali, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan selanjutnya direndam dalam larutan Betadin.

c. Sterilisasi LAF

Laminar Air Flow disterilkan dengan disemprot alkohol 70% dan diterangi lampu UV selama 1 jam sebelum digunakan. Menyalakan *blower* 5 menit sebelum pelaksanaan penanaman dan memasukkan alat-alat penanaman seperti pinset, skalpel, gelas ukur, gunting, dan botol kultur berisi medium tanam steril, lampu spiritus, cawan petri ke dalam *Laminar Air Flow* (LAF)

d. Inokulasi eksplan

Penanaman dilakukan dengan cara memotong eksplan yang telah steril di dalam cawan petri yang berisi larutan Betadin berdasarkan perlakuan yang diujikan hingga diperoleh bentuk pangkal tunas yang agak runcing. Eksplan yang telah dipotong kemudian ditanam dalam medium sesuai dengan perlakuan dengan penanaman satu eksplan pada setiap botol. Eksplan yang telah ditanam kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil* dan bagian mulut botolnya dibungkus dengan plastik wrap.

4. Inkubasi

Proses inkubasi dimulai dengan mensterilkan rak-rak inkubasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dilap dengan kain bersih. Suhu ruang inkubasi kultur antara 24-27 °C dan kelembaban berkisar 70% serta intensitas cahaya 1000 lux selama 24 jam setiap harinya. Botol-botol diletakkan secara acak kemudian diamati pertumbuhannya sesuai dengan parameter pengamatan yang telah ditentukan.

E. Parameter Pengamatan

1. Optimasi Sterilisasi

a. Persentase eksplan *browning*

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan cara menghitung jumlah tunas yang *browning* dengan kriteria apabila eksplan berwarna coklat lebih dari 50 %. Perhitungan persentase eksplan yang *browning* dilakukan di akhir pengamatan dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan } \textit{browning} = \frac{\text{Jumlah eksplan } \textit{browning}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

b. Persentase eksplan terkontaminasi

Jumlah eksplan yang terkontaminasi dihitung setiap hari selama 8 minggu. Kriteria eksplan yang terkontaminasi yaitu eksplan yang terkontaminasi oleh jamur atau bakteri. Persentase eksplan yang terkontaminasi dihitung di akhir pengamatan dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan terkontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100 \%$$

c. Jenis dan waktu kontaminasi

Pengamatan dilakukan pada eksplan yang mengalami kontaminasi dengan mengamati penyebab terjadinya kontaminasi dan mencatat jenis dan waktu kontaminasi.

d. Persentase eksplan hidup

Eksplan yang hidup dihitung setiap hari selama 8 minggu. Kriteria eksplan hidup adalah eksplan hidup dan berwarna hijau lebih dari 50% dan tidak terkontaminasi serta tidak *browning*. Persentase eksplan hidup dihitung pada akhir pengamatan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persentase eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100 \%$$

2. Induksi Tunas Tin

Pengumpulan data dilakukan dengan cara mengamati pertumbuhan eksplan, parameter yang diamati adalah:

a. Persentase eksplan terkontaminasi

Eksplan yang terkontaminasi dihitung setiap hari selama 8 minggu. Kriteria eksplan yang terkontaminasi yaitu eksplan yang terkontaminasi oleh jamur atau bakteri. Persentase eksplan yang terkontaminasi dihitung di akhir pengamatan dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan terkontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100 \%$$

b. Persentase eksplan hidup

Eksplan yang hidup dihitung setiap hari selama 8 minggu. Kriteria eksplan hidup adalah eksplan hidup dan berwarna hijau lebih dari 50% dan tidak terkontaminasi serta tidak *browning*. Persentase eksplan hidup dihitung pada akhir pengamatan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persentase eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100 \%$$

c. Persentase pertumbuhan kalus

Pertumbuhan kalus diamati setiap minggu, mulai dari 1 minggu setelah penanaman sampai minggu ke-8. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan yang membentuk kalus pada masing-masing perlakuan kemudian dibagi dengan jumlah eksplan tiap perlakuan dan dikalikan 100 dinyatakan dalam persen (%).

$$\text{Persentase kalus} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk kalus}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

d. Persentase pembentukan tunas

Pengamatan persentase pembentukan tunas dilakukan setiap minggu dengan cara mengamati jumlah eksplan yang membentuk tunas pada masing-masing perlakuan, dinyatakan dalam persen (%)

$$\text{Persentase tunas} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk tunas}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

e. Persentase eksplan *browning*

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan cara menghitung jumlah tunas yang *browning* dengan kriteria apabila eksplan berwarna coklat lebih

dari 50 %. Perhitungan persentase eksplan yang *browning* dilakukan di akhir pengamatan dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan } \textit{browning} = \frac{\text{Jumlah eksplan } \textit{browning}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

f. Jumlah tunas

Jumlah tunas tiap eksplan tiap perlakuan dihitung seminggu sekali sampai minggu ke-8.

g. Tinggi eksplan

Pengamatan dilakukan setiap minggu dari pertama penanaman dengan cara mengukur tinggi tunas dari pangkal tunas/permukaan medium sampai pucuk tunas dengan menggunakan penggaris dan dinyatakan dalam centimeter (cm). Hasil pengukuran merupakan selisih dari tinggi eksplan pada saat inokulasi dan tinggi pada akhir pengamatan.

h. Jumlah daun

Jumlah daun tiap eksplan tiap perlakuan dihitung seminggu sekali sampai dengan minggu ke-8

i. Persentase eksplan berakar

Eksplan yang berakar dihitung di akhir pengamatan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persentase eksplan berakar} = \frac{\text{Jumlah eksplan berakar}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

j. Persentase warna eksplan

Pengamatan warna eksplan dilakukan setiap minggu sampai dengan minggu ke-8 menggunakan *Munsell Plant Tissue Colour Chart*. Metode

yang digunakan yaitu dengan metode skoring dan dinyatakan dengan persentase. Penelitian Zainal, M (2011) menggunakan rumus:

$$\text{Persentase warna eksplan} : = \sum \frac{(n \times v)}{Z \times N} \times 100 \%$$

- n = Jumlah sampel yang memiliki nilai skor sama
 v = Nilai skor yang menunjukkan intensitas warna
 Z = Skor yang tertinggi
 N = Jumlah sampel yang diamati

Skor	Warna Eksplan
4	5 GY 5/10 – 7/8
3	2,5 GY 7/8 – 7/10
2	2,5 GY 8/8 – 8/12
1	2,5 Y 5/4 – 8/6

F. Analisis Data

Analisis data jumlah tunas, tinggi eksplan dan jumlah daun dilakukan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf nyata $\alpha = 5 \%$. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang dicobakan, maka dilakukan uji lanjutan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan $\alpha = 5 \%$. Data persentase tidak dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA), akan tetapi dilakukan perhitungan rata-rata perlakuan dan perbandingan antar perlakuan.