

BAB III

METODE PENELTIAN

3.1. Tempat dan waktu percobaan

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya pada bulan April sampai Agustus 2023.

3.2. Alat dan bahan percobaan

Alat yang digunakan adalah *Laminar air-flow* (LAF), *Autoclave*, *magnetic hotplate stirrer*, rak, *shaker*, botol-botol kultur, erlenmeyer, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, *thermohygrometer*, mikropipet, mikropipet tip, *scalpel*, gunting bedah, pinset, *puncher* pelubang kertas berdiameter 0,6 cm, spatula, pipet tetes, pipet ukur, lampu bunsen, kompor, tabung gas, plastik wrap, label, tisu, dan alat tulis.

Eksplan yang digunakan berasal dari daun cengkeh dari bibit umur enam bulan. Bahan kimia yang digunakan adalah larutan Murashige dan Skoog (MS), 2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D), Air kelapa, Myo-inositol, vitamin (Nicotine acid, Pyridoxine HCl, Thiamine HCl, Glycine), akuades, sukrosa, unsur makronutrient dan makronutrient, alkohol 70%, alkohol 96%, natrium hipoklorit (NaOCl) 10% dan 30%, detergen, bakterisida 2 g/L, fungisida 2 g/L, natrium hidroksida (NaOH), hidrogen klorida (HCl), Spirtus, *phytagel*, dan pH indikator universal.

3.3. Metode peneltian

Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan mengkombinasikan dua faktor perlakuan, faktor pertama adalah 2,4-D (K) dengan 4 taraf konsentrasi yaitu:

$$k_1 = 0,5 \text{ ppm}$$

$$k_2 = 1 \text{ ppm}$$

$$k_3 = 1,5 \text{ ppm}$$

$$k_4 = 2 \text{ ppm}$$

$(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh perlakuan A ke-i dan perlakuan B ke-j

ε_{ijk} = Galat percobaan pada ulangan ke-k dari perlakuan A ke-i dan Perlakuan B ke-j

Tabel 3. Daftar sidik ragam (Paiman, 2015)

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F _{0,05}
Perlakuan	$(4 \cdot 3) - 1 = 11$	JK P	$\frac{JK K}{db K}$	$\frac{KT P}{KT P}$	2,22
K	$4 - 1 = 3$	JK K	$\frac{JK K}{db K}$	$\frac{KT K}{KT G}$	3,01
A	$3 - 1 = 2$	JK A	$\frac{JK A}{db A}$	$\frac{KT A}{KTG}$	3,40
Interaksi K × A	$(4-1)(3-1) = 6$	JK KA	$\frac{JK KA}{db KA}$	$\frac{KT KA}{KTG}$	2,51
Galat	$4 \cdot 3(3 - 1) = 24$	JK G	$\frac{JK G}{db G}$		
Jumlah	$(3 \cdot 12) - 1 = 35$	JK T			

Keterangan :

$$FK = \frac{\sum Y_{ij}^2}{kxaxr}$$

$$JK \text{ total (JKt)} = \sum (Y_{ijk})^2 - FK$$

$$JK \text{ Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum (\sum Y_j)^2}{R} - FK$$

$$JK k = \frac{\sum (\sum Y_j)^2}{ra} - FK$$

$$JK a = \frac{\sum (\sum Y_j)^2}{rk} - FK$$

$$JK ka = JKP - JKK - JKA$$

$$JK \text{ Galat (JKG)} = JKT - JKP$$

Kaidah pengambilan keputusan dikemukakan oleh Gomez dan Gomez (2010) seperti pada tabel 4.

Tabel 4. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisis	Kesimpulan Analisis	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan

Jika berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda *Duncan* pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$SSR = (\alpha, dbg, p)$$

$$LSR (\alpha, dbg, p) = SSR (\alpha, dbg, p) \times S_x$$

Nilai S_x dicari dengan rumus sebagai berikut:

1. Bila terjadi interaksi

$$S_x^- = \sqrt{\frac{KT Galat}{r}}$$

2. Bila tidak terjadi interaksi, tetapi berbeda nyata pada perlakuan Faktor k

$$S_x^- k = \sqrt{\frac{KT Galat}{r \cdot a}}$$

3. Bila tidak terjadi interaksi, tetapi berbeda nyata pada perlakuan Faktor a

$$S_x^- a = \sqrt{\frac{KT Galat}{r \cdot k}}$$

Keterangan:

S_x Galat baku rata-rata (*Standard Error*)

KTG Kuadrat tengah galat

R Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

SSR *Significant studentized range*

α Taraf nyata

<i>dbg</i>	Derajat bebas galat
<i>p</i>	Jarak antara perlakuan (<i>range</i>)
<i>LSR</i>	<i>Least significant range</i>

3.4.Prosedur penelitian

3.4.1. Pemilihan bahan eksplan

Eksplan yang dipilih untuk dikulturkan berasal dari daun tanaman cengkeh yang ada di daerah pucuk dari bibit yang berusia enam bulan. Daun yang digunakan adalah daun pada ibu tangkai kedua dari atas daun yang masih muda dan produktif serta sehat terbebas dari penyakit.

3.4.2. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat meliputi sterilisasi pinset, *scalpel*, petridish, *laminar air flow*, dan rak inkubasi. Langkah-langkah sterilisasi pinset, *scalpel* dan petridish :

- a. Pinset, *scalpel*, dan petridish dibungkus dengan kertas putih lalu direkatkan dengan selotip.
- b. Alat-alat yang sudah dibungkus kertas putih, selanjutnya dilapisi dengan plastik tahan panas dan ujung plastik *distapler*.
- c. Bungkusannya kemudian diikat dengan menggunakan karet gelang.
- d. Alat-alat yang sudah dibungkus, selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.4.3. Sterilisasi akuades

Sterilisasi akuades bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme di dalam akuades yang nantinya digunakan untuk pembuatan larutan stok dan sterilisasi eksplan. Langkah-langkah sterilisasi akuades :

- a. Akuades disemprotkan sebanyak 160 ml ke dalam botol kemudian botol ditutup dengan penutup botol.
- b. Botol-botol akuades dimasukan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C serta tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.4.4. Sterilisasi *laminar air flow*

- a. Alkohol 70% disemprotkan ke dalam ruang *laminar air flow*.
- b. *Laminar air flow* yang sudah disemprotkan alkohol 70%, dilap dengan tisu kertas.
- c. Sinar UV dihidupkan selama 60 menit. Jenis lampu ultraviolet yang digunakan sebagai alat untuk membunuh mikroorganisme seperti bakteri adalah UV-C dengan panjang gelombang 200-260 mm.

3.4.5. Sterilisasi rak inkubasi

- a. Alkohol 70% disemprotkan ke bagian kaca rak inkubasi.
- b. Kaca yang sudah disemprot alkohol 70%, dilap dengan kain lap / *tissue* kertas.

3.4.6. Sterilisasi eksplan

1. Sterilisasi permukaan eksplan

Sterilisasi permukaan eksplan dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan kontaminan yang berasal dari lapangan. Langkah-langkah sterilisasi permukaan eksplan :

- a. Eksplan dicuci dengan air mengalir dan deterjen selama 30 menit.
- b. Eksplan kemudian dibilas dengan menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali.
- c. Eksplan kemudian direndam dalam larutan yang berisi bakterisida 2 g/L dan fungisida 2 g/L selama 60 menit.
- d. Setelah itu eksplan dibilas kembali dengan menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali

2. Sterilisasi di dalam Laminar Air Flow (LAF)

- a. Alkohol disemprotkan pada botol eksplan yang berisi eksplan serta pintu sebelum memasuki ruangan.
- b. Lampu UV dimatikan dan kemudian menyalakan blower dan lampu LED.
- c. Eksplan direndam dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 30% selama 10 menit.
- d. Setelah itu eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali.

- e. Eksplan kemudian direndam dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 10% selama 5 menit.
- f. Eksplan dibilas kembali dengan menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali.
- g. Eksplan direndam dalam alkohol 70% selama 3 menit.

3.4.7. Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok bertujuan untuk menghindari penimbangan banyak komponen secara berulang. Selain itu, untuk mempermudah penimbangan hara mikro yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit (Dwiyani, 2015). Komposisi larutan stok dan media MS dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Pembesaran larutan stok dan komposisi media MS 1 L

Kode larutan stok dan Pembesarannya	Bahan Unsur	Berat (g) untuk Volume 1 liter	Konsentrasi dalam Media MS (mg/L)	Volume larutan stok untuk 1 liter media (ml/L)
A (50x)	NH ₄ NO ₃	82,5	1650	20
B (50x)	KNO ₃	95,0	1900	20
C (200x)	KH ₂ PO ₄	39,0	195	5
	H ₃ BO ₃	1,24	6,2	
	KI	0,166	0,83	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05	0,25	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	0,025	
D (200x)	CaCl ₂ .H ₂ O	88	440	5
E (200x)	MgSO ₄ .7H ₂ O	74	370	5
	MnSO ₄	4,46	22,3	
	ZnSO ₄	1,72	8,6	
	CuSO ₄ .H ₂ O	0,005	0,025	
F (200x)	Na ₂ EDTA	3,73	37,3	10
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78	27,8	
Vit (100x)	<i>Thiamine-HCl</i>	0,01	0,1	10
	<i>Nicotinic acid</i>	0,05	0,5	
	<i>Pyridoxine-HCl</i>	0,05	0,5	
	<i>Glycine</i>	0,2	2	
MyO (100x)	Myo-Inositol	10	100	10

Sumber : (Murashige dan Skoog, 1962)

a. Pembuatan larutan stok hara makronutrien dan mikronutrien :

Larutan stok hara terdiri dari stok A (NH_4NO_3), stok B (KNO_3), stok C (KH_2PO_4 , H_3BO_3 , KI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), stok D ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), stok E ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , ZnSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), dan stok F (Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Stok A,B dibuat 50 kali pembesaran, sementara stok C,D,E, dan F dibuat 200 kali pembesaran (Tabel 5) untuk pemakaian pembuatan media masing-masing 1 liter. Adapun tahapannya sebagai berikut:

- 1) Bahan kimia yang akan digunakan yaitu unsur hara makro dan mikro ditimbang menggunakan timbangan analitik sesuai jumlah yang sudah ditentukan.
- 2) Bahan yang sudah ditimbang, kemudian dilarutkan satu per satu ke dalam erlenmeyer yang berisi 200 ml akuades secara terpisah sesuai dengan komposisi dari masing-masing larutan stok. Pembuatan larutan dimulai dengan melarutkan unsur NH_4NO_3 sebagai larutan stok A, KNO_3 sebagai larutan stok B, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , KI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok C, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok D, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , ZnSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan E, dan Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan F.
- 3) Semua bahan yang telah dilarutkan diaduk secara merata menggunakan *hot plate magnetic stirrer*, setelah semua unsur hara larut, maka larutan ditera sampai volume mencapai 1 L menggunakan gelas ukur.
- 4) Larutan stok hara makro yang sudah jadi sebanyak 1 L dimasukkan ke dalam botol gelas berwarna coklat. Selanjutnya botol diberi label dan tanggal pembuatan stok dan disimpan pada suhu lemari dingin.
- 5) Botol larutan stok F dibungkus menggunakan alumunium foil agar tidak ada cahaya yang masuk, karena akan mempengaruhi reaksi dalam larutan tersebut.

b. Pembuatan larutan stok vitamin :

- 1) Bahan-bahan yang diperlukan, yaitu *Thiamine-HCl*, *Nicotinic acid*, *Pyridoxine-HCl*, dan *Glycine* ditimbang menggunakan timbangan analitik.
- 2) Satu persatu bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi akuades sebanyak 50 ml sambil diaduk dan menggunakan *magnetic stirrer*.

- 3) Setelah semua bahan terlarut sempurna, dilakukan peneraan volume vitamin menjadi 100 ml menggunakan labu ukur.
 - 4) Larutan stok vitamin yang sudah jadi kemudian dimasukkan ke dalam botol gelas berwarna coklat.
 - 5) Botol gelas berwarna coklat diberi label dan disimpan di dalam lemari pendingin untuk menjaga kualitas.
- c. Pembuatan larutan stok Myo-inositol, dilakukan dengan 100 kali konsentrasi yang disesuaikan dengan komposisi media MS dalam 100 ml aquades
- d. Pembuatan larutan stok 2,4-D 100 ppm

Pembuatan larutan stok 2,4-D 100 ppm dalam 100 ml aquades dibuat dengan perhitungan yang disajikan pada Lampiran 3, dari perhitungan tersebut ditetapkan bahwa untuk membuat larutan stok 2,4-D 100 ppm dalam 100 ml aquades dibutuhkan 2,4-D 10 mg. Tahapan pembuatannya sebagai berikut:

- 1) Hormon 2,4-D ditimbang sebanyak 10 mg.
- 2) 2,4-D yang telah ditimbang dilarutkan dengan menambahkan aquades steril hingga volume 100 ml.
- 3) Larutan stok 2,4-D yang sudah larut dalam 100 ml aquades dimasukkan ke dalam botol cokelat dan disimpan di lemari pendingin.

3.4.8. Penyiapan larutan stok air kelapa

Kelapa yang digunakan adalah kelapa muda yang seragam pada pohon dan tandan yang sama. Air kelapa yang digunakan adalah buah kelapa yang daging buahnya tidak terlalu lunak, tetapi juga belum terlalu keras (umur 210–240 hari) (Tuhuteru, Hehanussa, dan Raharjo, 2012). Air kelapa yang ditambahkan dalam media, difilter dengan kertas saring *milipore* sebanyak tiga kali, lalu dimasukkan ke dalam botol yang steril setelah itu ditutup dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin (Saepudin, Yulianto, dan Aeni, 2020). Air kelapa yang ditambahkan dalam media dibuat sesuai dengan konsentrasi pada perlakuan dalam persentase dengan perbandingan persentase air kelapa dan aquades dalam volume 100 ml seperti yang disajikan pada Lampiran 4. perhitungan konsentrasi air kelapa.

3.4.9. Pembuatan media MS (Murashige and Skoog)

Volume larutan stok yang diambil untuk 1 liter media didapatkan dengan rumus sebagai berikut (Dwiyani, 2015) : $V_1N_1 = V_2N_2$

Keterangan :

V_1 = volume larutan stok yang akan diambil

V_2 = 1000 ml atau 1 L

N_1 = berat (g)/(mg) senyawa yang disesuaikan dengan kebutuhan komposisi media dalam 1000 mL atau 1 L.

N_2 = berat (mg) senyawa yang disesuaikan dengan kebutuhan komposisi media dalam 1000 mL atau 1 L.

Langkah-langkah pembuatan media MS (Dwiyani, 2015) :

- a. Komposisi senyawa tiap media dapat dilihat dalam Tabel 5.
- b. Setelah pengambilan tiap larutan stok A, B, C, D E, F, vitamin, Myo-inositol, larutan 2,4-D dan air kelapa sesuai perlakuan, larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 1 L.
- c. Selanjutnya sukrosa 30 g/L dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades sampai volume 900 ml.
- d. Kemudian pH larutan diukur dengan pH meter dan diusahakan pH antara 5,5 sampai 5,8. Jika pH terlalu rendah dinaikkan dengan menambahkan NaOH 0,1 N dan jika pH terlalu tinggi diturunkan dengan menambahkan HCl 0,1 N.
- e. *Phytigel* 8 g/L dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian tambahkan akuades sampai 1 L.
- f. Sambil diaduk medium yang berisi larutan media dipanaskan hingga suhu 80°C kemudian masukan kurang lebih 25 ml (sesuai dengan volume botol) ke dalam botol kultur dan tutup rapat dengan penutup botol.
- g. Label yang bertuliskan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan, diberikan pada setiap botol.
- h. Sterilisasi media kemudian dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama kurang lebih 20 menit.

- i. Botol kultur yang sudah disterilisasi dengan autoklaf, selanjutnya dikeluarkan dari autoklaf dan disimpan di ruang penyimpanan.

3.4.10. Sterilisasi media kultur

- a. Media kultur yang sudah dibuat dituangkan ke dalam botol kultur.
- b. Media kultur yang sudah dimasukkan ke dalam botol kultur selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama kurang lebih 20 menit.
- c. Media kultur kemudian didinginkan lalu disimpan di tempat yang steril.

3.4.11. Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) secara aseptik. Penanaman dilakukan dengan cara menurut Rasud *et al.*, (2019), yaitu eksplan yang sudah disterilisasi diletakkan dalam cawan petri steril. Eksplan tersebut kemudian dipotong-potong dengan bentuk lingkaran menggunakan *puncher* pelubang kertas berdiameter 0,6 cm, kemudian ditanam pada media induksi kalus. Eksplan dimasukkan ke dalam botol media menggunakan pinset steril. Botol ditutup rapat dengan tutup botol yang telah steril, kemudian dilapisi dengan *cling wrap* untuk menghindari masuknya kontaminan ke dalam botol media, kemudian dilakukan pelabelan dan tanggal saat penanaman. Botol-botol kultur yang telah ditanami diinkubasi selama pengamatan pada rak-rak kultur di dalam ruang inkubasi yang memiliki suhu 20°C sampai 22°C dengan intensitas penyinaran sebesar 1000 lux selama 24 jam dalam sehari.

3.5.Variabel pengamatan

3.5.1. Pengamatan penunjang

- a. Suhu dan kelembapan

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mencatat suhu dan kelembaban setiap pagi hari menggunakan *thermohigrometer* sejak eksplan ditanam.

b. Persentase kontaminasi

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan yang terkontaminasi oleh jamur dan bakteri setiap satu minggu sekali. Dihitung dengan menggunakan rumus (Sudiyanti, Rusbana, dan Susiyanti, 2017) :

$$\% \text{ kontaminasi} = \sum \frac{\text{eksplan terkontaminasi}}{\sum \text{total eksplan}} \times 100\%$$

c. Kondisi umum eksplan daun cengkeh

Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan yang terjadi pada eksplan daun cengkeh, dengan membandingkan pada awal pengamatan (7 HST) dan akhir pengamatan (60 HST).

d. Saat muncul kalus

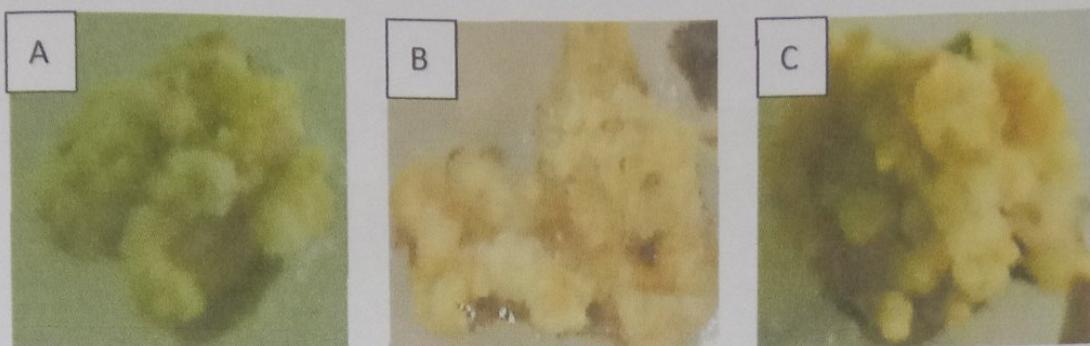
Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung hari saat munculnya kalus pertama kali kemudian dirata-ratakan berdasarkan setiap perlakuan dan dinyatakan dalam HST (Hari Setelah Tanam). Pembentukan kalus diawali dengan pembengkakan pada eksplan dan munculnya tonjoloan-tonjolan putih yang saling berjejal pada permukaan eksplan.

3.5.2. Pengamatan utama

a. Tekstur Kalus

Pengamatan tekstur kalus dilaksanakan pada akhir pengamatan dengan mengamati tekstur kalus yang terbentuk. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda kualitas suatu kalus yang dikelompokkan menjadi *friable* (remah), *intermediet*, dan *nonfriable* (kompak) (Gambar 4). Pengamatan tekstur kalus dilakukan dengan menerapkan skoring dimana kalus yang terbentuk dibagi ke dalam 3 tingkatan :

1. : kompak
2. : intermediet
3. : remah



Gambar 4. Contoh Tekstur Kalus. A) Remah, B) Kompak, C) Intermediet

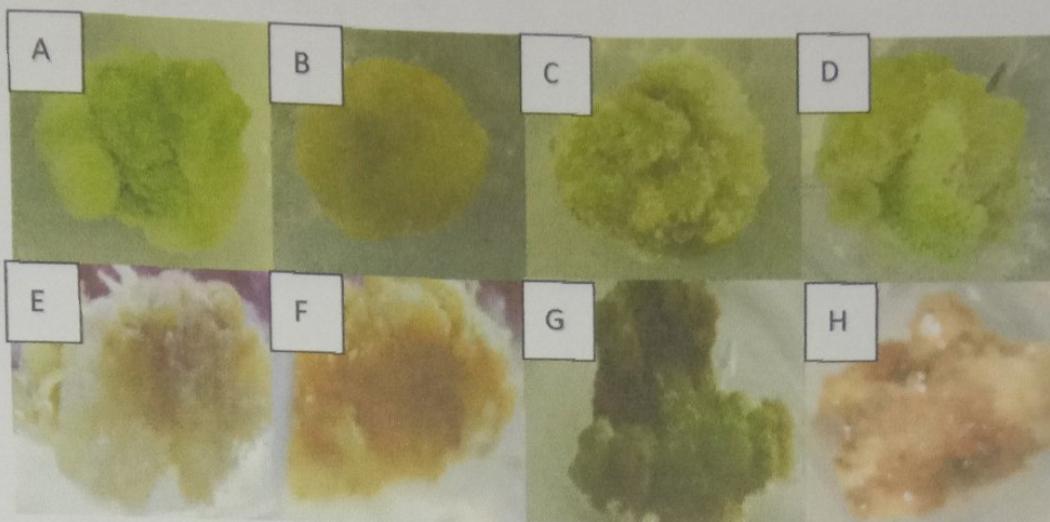
Sumber : Rasud *et al.*, (2019)

Menurut Rasud dan Bustaman (2016); dan Yelnititis (2012) kalus yang baik adalah kalus yang bertekstur remah karena mudah dalam memisahkannya menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi dalam upaya perbanyakkan massa sel. Selanjutnya Rasud dan Bustaman (2016) menyatakan bahwa kalus dengan tekstur kompak sulit untuk dilepaskan dan terlihat padat dan kalus intermediet adalah kalus yang sebagian tekturnya kompak dan lainnya remah. Menurut Indah dan Ermavitalini (2013) kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak.

b. Warna kalus

Pengamatan warna kalus akan dilaksanakan pada akhir pengamatan dengan mengamati secara visual warna kalus seperti pada Gambar 3 dan menerapkan skoring untuk membantu dalam penentuan warna. Thomy (2012) menyatakan penentuan warna kalus berdasarkan skoring :

1. : coklat,
2. : kuning,
3. : putih kecoklatan,
4. : hijau kecoklatan,
5. : kuning kecoklatan,
6. : hijau kekuningan,
7. : hijau keputihan, dan
8. : hijau



Gambar 3. Contoh warna Kalus. A) Hijau, B) Kuning, C) Hijau Keputihan, D) Hijau Kekuningan, E) Putih Kecoklatan, F) Kuning Kecokletan, G) Hijau Kecokletan, H) Coklat

Sumber : Lizawati dan Desfira (2012), Siahaan, Damanik, dan Bangun (2017), Sinaulan, Lengkong, dan Tulung (2018), Rasud *et al.*, (2019)

Jaringan kalus yang dihasilkan suatu eksplan mampu menghasilkan warna yang berbeda-beda. Menurut Yelnitis (2012) kalus yang baik adalah kalus yang memiliki warna hijau, karena mengindikasikan kandungan klorofil yang banyak. Adapun menurut Mahadi *et al.* (2016), kalus dengan warna pigmen putih dan kekuningan yang merupakan kalus yang bersifat embriogenik, dan warna coklat yang menandakan kemunduran fisiologis akibat kekurangan unsur hara atau hormon dan juga disebabkan oleh metabolisme senyawa fenolik yang bersifat toksik.

c. Persentase eksplan berkalus

Pengamatan dilakukan dengan menghitung dan mempersentasekan jumlah eksplan yang berkalus dengan menggunakan rumus perhitungan (Sudiyanti *et al.*, 2017) :

$$\% \text{ eksplan berkalus} = \sum \frac{\text{eksplan berkalus}}{\sum \text{total eksplan}} \times 100\%$$