

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada bulan Mei sampai dengan Juli 2011.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan plastik, Beaker glass, cover glass, objek glass, gelas ukur, spatula, silet, gunting, pipet tetes, erlenmeyer, mikroskop binokuler, timbangan elektrik, kompor listrik, kamera, kertas saring, kertas label, steroform, tissue, alumunium foil, oven, kulkas, bunsen, kuas dan mistar.

Bahan yang digunakan adalah 3 kg umbi bawang merah yang diperoleh dari pasar Koga, Bandar Lampung. Biji kembang sunsang yang diperoleh dari pekarangan rumah salah satu warga Bandar Lampung, asam asetat 45%, HCL 1 N, larutan pewarna aceto-orcein, kloform, gliserin, larutan farmers, aquades, kutek, dan minyak imersi.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini disusun secara faktorial menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat ulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu 0%, 25%, 50% dan 75%. Faktor kedua adalah lama perendaman terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Hasil pengamatan jumlah kromosom dan kelainan mitosis yang teramati dibandingkan dengan kontrol. Data indeks mitosis yang diperoleh diuji dengan Analisis Ragam. Perbedaan antara perlakuan diuji dengan beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5%.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pembuatan ekstrak air biji kembang sunsang

Ekstrak air biji kembang sunsang dibuat menggunakan metode Harborne (1989). Seratus gram biji kembang sunsang dibersihkan kemudian dikeringkan. Setelah kering, biji digiling dengan menggunakan *Hammer mill*. Biji yang telah menjadi serbuk kemudian dimaserasi dalam aquades dengan perbandingan 1:1 selama 3 x 24 jam, setelah itu disaring. Tahap maserasi ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil maserasi yang disebut maserat dipisahkan dengan suhu 40-50 °C dalam *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak pekat.

2. Pembuatan Ekstrak Biji Kembang Sungsang Untuk Perlakuan

Pembuatan larutan ekstrak untuk perlakuan dilakukan dengan metode pengenceran. Banyaknya volume larutan ekstrak stok yang diencerkan (dalam satuan ml) sesuai dengan jumlah konsentrasi perlakuan yang diinginkan. Sedangkan volume aquadest yang dicampurkan adalah 50 ml dikurangi banyaknya larutan stok yang diambil untuk diencerkan.

Konsentrasi larutan yang digunakan untuk perlakuan adalah 0%, 25%, 50%, dan 75%. Daftar komposisi larutan untuk perlakuan dapat dilihat pada

Tabel 1 berikut ini :

Tabel 1. Komposisi Larutan

Konsentrasi	Ekstrak(ml)	Aquades (ml)	Volume (ml)
0%	0	50	50
25%	12.5	37,5	50
50%	25	25	50
75%	37,5	12,5	50

3. Pembuatan Larutan Fiksatif Farmers

Larutan fiksatif farmers merupakan salah satu senyawa yang digunakan dalam pembuatan sajian histologi. Larutan fiksatif farmers dibuat dengan melarutkan 45 ml asam asetat glasial dalam 55 ml aquades, kemudian dihomogenkan (Guhardja, 1988).

4. Pembuatan Larutan Pewarna Aceto-orcein

Aceto-orcein adalah salah satu pewarna yang sering digunakan karena mudah didapat dan lebih cepat menyerap warna sehingga visualisasi kromosom dapat terlihat jelas. Larutan Aceto-orcein dibuat dengan mencampurkan 1 g bubuk orcein ke dalam 45 ml asam asetat glasial kemudian dipanaskan sampai mendidih lalu didiamkan sampai dingin. Setelah dingin, larutan orcein ditambah 55 ml aquades. Kemudian disaring menggunakan kertas saring. Larutan hasil saringan dicampur dengan 10 ml HCL 1% dan dihomogenkan (Guhardja, 1988).

5. Perendaman Umbi Bawang Merah dalam Ekstrak Air Biji Kembang Sungsang

Sebanyak 12 umbi bawang merah dengan berat dan ukuran yang hampir sama disayat bagian pangkal umbinya sekitar 0,1 cm untuk memacu tumbuhnya akar baru. Pangkal umbi bawang merah yang telah disayat direndam dengan lama perendaman sesuai perlakuan di dalam cawan plastik yang berisi ekstrak air biji kembang sungsang dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Setelah perlakuan, umbi dicuci dengan aquades yang mengalir dan dipindahkan ke cawan plastik yang berisi aquades, sampai umbi tumbuh akar.

6. Preparasi Mitosis

Pembuatan sediaan mitosis dilakukan menggunakan metode Squash (Gunarso, 1989). Pengambilan akar dilaksanakan sekitar pukul 08.00 – 10.00 WIB karena waktu tersebut merupakan waktu biologis sel yang sedang aktif membelah.

Akar bawang merah dipotong sepanjang 3-5 mm dari ujung akar, kemudian dimasukkan dalam aquades dingin selama 15 menit sebelum didinginkan dalam lemari es dengan suhu 5°C selama 10 menit, kemudian dicuci dengan aquades biasa. Pra perlakuan ini berfungsi untuk mendapatkan pembengkakan sel sehingga kromosom akan lebih mudah diamati karena kromosom mengkerut dan memendek.

Akar bawang merah yang telah dicuci diberi larutan fiksatif Farmers selama 15 menit kemudian dimasukkan dalam lemari es pada suhu 5°C. Perlakuan ini berfungsi untuk mempertahankan kondisi jaringan atau sel agar tidak mengalami perubahan ukuran dan bentuk serta menghentikan proses autolisis dan membuat ujung akar menjadi keras.

Selanjutnya, potongan akar dicuci dengan aquades biasa. Setelah dicuci akar bawang merah diberi pewarna aceto-orcein agar mudah diamati, kemudian dioven selama 15 menit. Akar bawang yang telah diberi pewarna aceto-orcein diambil menggunakan kuas, dan diletakkan pada objek glass. Ujung akar yang berada pada gelas objek dipotong ± 1 mm, ditetesi pewarna aceto-orcein sebanyak 1-2 tetes kemudian dilewatkan di atas api dan dijaga agar larutan aceto orcein tidak sampai mendidih agar pewarna lebih

meresap. Potongan ujung akar kemudian ditutup dengan cover glass sambil sedikit ditekan supaya sel ujung akar umbi bawang merah menyebar.

Sediaan ujung akar bawang diamati di bawah mikroskop. Jika perbesaran mikroskop mencapai 1000 kali digunakan minyak imersi agar gambar terlihat jelas. Fase Mitosis yang terlihat baik difoto dengan kamera digital.

E. Parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati meliputi indeks mitosis dan kelainan mitosis.

1. Indeks Mitosis

Indeks mitosis sel ujung akar umbi bawang merah diukur dengan cara menghitung sel yang sedang bermitosis (profase, metafase, anafase dan telofase) dan sel pada fase interfase. Pengukuran ini dilakukan pada 10 bidang pandang untuk setiap preparat.

Nilai indeks Mitosis dihitung menggunakan rumus dari Pandey *et al.* (1994) yaitu :

$$IM = \frac{\text{Jumlah sel dalam fase mitosis}}{\text{Jumlah total sel yang diamati}} \times 100\%$$

2. Kelainan Mitosis

Pengamatan dilakukan pada 10 bidang pandang untuk setiap preparat.

Kelainan mitosis yang tampak pada preparat kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital. Hasil foto yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan mitosis normal dari Suryo (1995).