

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dari Mei sampai dengan Juli 2011.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah cawan petri, gelas objek, gelas penutup, mikroskop, piper tetes, tabung reaksi, erlenmeyer, timbangan, gelas ukur kecil, beaker gelas, tissue, kertas saring, karter, kuas, spatula, pembakar bunsen, dan sterofom.

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian adalah 3 kg umbi bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) yang diperoleh dari pasar Koga, Bandar Lampung. Biji kembang sunngsang (*Gloriosa superb* L) yang diperoleh dari pekarangan rumah salah satu warga di Bandar Lampung, larutan famers, kutek, HCL 1N, larutan pewarna *acetoorcein*, aquades, klroform, minyak imersi, gliserin, asam asetat 45%

C. Rancangan Penelitian

Penelitian ini disusun secara faktorial dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat ulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi yang terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu 0%; 25%; 50%; dan 75% dan faktor kedua lama perendaman umbi sebanyak tiga taraf perlakuan yaitu 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Data yang diperoleh di analisis dengan menggunakan dua cara. Pertama, analisis kualitatif untuk data indeks mitosis menggunakan Analisis Ragam pada $\alpha = 5\%$ dilanjutkan dengan uji lanjut menggunakan BNT pada $\alpha = 5\%$. Kedua, observasi yang dilakukan untuk membandingkan kelainan mitosis dari sel akar bawang merah yang mendapat perlakuan dengan ekstrak.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Kloroform Biji Kembang Sungsang

Ekstrak kloroform biji kembang sungsang dibuat dengan menggunakan metode Harborne (1996). Biji kembang sungsang yang telah dikeringkan di udara terbuka, digiling menggunakan blender. Serbuk biji kemudian dimaserasi menggunakan aquades selama 2x24 jam kemudian disaring. Hasil saringan diekstraksi dengan kloroform dalam corong pemisah. Banyaknya kloroform yang digunakan adalah 1:1 (kloroform : ekstraksi hasil maserasi).

Ekstraksi kolkisin dengan kloroform dilakukan dengan memasukan hasil maserasi ke dalam corong pemisah, kemudian ditambahkan 1 bagian kloroform lalu dikocok agar larutan homogen. Selama pengocokan, kran corong pemisah dibuka sesekali untuk mengeluarkan gas yang terbentuk. Setelah homogen larutan tersebut didiamkan sehingga terbentuk dua fase larutan. Larutan pertama yang terletak di bagian bawah berisi senyawa yang larut dalam kloroform dan larutan yang kedua berisi senyawa yang larut dalam air.

2. Pembuatan Larutan Ekstrak Kloroform Biji Kembang Sungsang Untuk Perlakuan.

Pembuatan larutan ekstrak kloroform biji kembang sungsang untuk perlakuan dilakukan dengan metode pengenceran. Banyaknya volume aquades yang dicampur (ml) dalam tabung pengencer adalah 50 ml dikurangi banyaknya larutan stok yang diambil untuk diencerkan. Misalnya untuk membuat konsentrasi ekstrak kloroform biji kembang sungsang 25 %, maka digunakan larutan ekstrak kloroform biji kembang sungsang sebanyak 12,5 ml dan ditambahkan aquades sebanyak 37,5 ml. Konsentrasi larutan yang digunakan untuk perlakuan adalah 0%, 25%, 50%, dan 75%.

3. Pembuatan Larutan Fiksatif Famers

Larutan fiksatif famers merupakan larutan yang digunakan dalam pembuatan preparat sayatan yang bertujuan untuk menghentikan proses metabolisme.

Larutan fiksatif famers dibuat dengan mencampurkan 45 ml asam asetat glasial dengan 55 ml aquades kemudian dihomogenkan (Guhardja, 1988).

4. Pembuatan Larutan Pewarna *Aceto-Orcein*

Aceto-orcein merupakan pewarna yang sering digunakan dalam pembuatan preparat untuk memperjelas objek pengamatan dalam preparat. Sebanyak 1 g serbuk orcein dicampur dengan 45 ml asam asetat glasial kemudian dipanaskan sampai mendidih. Setelah didinginkan, dicampur dengan 55 ml aquades lalu disaring menggunakan kertas saring. Sebanyak 10 ml HCL kemudian ditambahkan ke hasil saringan tersebut.

5. Perendaman Umbi Bawang Merah Ke Dalam Larutan Ekstrak Kloroform Biji Kembang Sungsang

Sebanyak 12 umbi bawang merah dipilih yang mempunyai berat dan ukuran yang hampir sama. Bagian pangkal umbi bawang disayat untuk merangsang pertumbuhan akar.

Umbi bawang yang sudah disayat pangkalnya direndam dengan cara merendam bagian pangkalnya dalam cawan plastik yang mengandung ekstrak kloroform biji kembang sungeang dengan lama perendaman dan konsentrasi sesuai perlakuan. Setelah diberi perlakuan umbi dicuci menggunakan aquades dan dipindahkan ke dalam cawan plastik yang berisi aquades, sampai tumbuh akar.

6. Pembuatan Preparat Mitosis

Pembuatan preparat mitosis dilakukan dengan metode squash (Gunarso, 1989). Pengambilan akar dilaksanakan pada pukul 08.00 – 10.00 WIB karena waktu tersebut merupakan waktu biologis sel sedang aktif membelah. Akar umbi bawang merah dipotong sepanjang 3-5 mm dari ujung, kemudian dimasukkan ke dalam aquades yang telah di dinginkan selama 15 menit selanjutnya disimpan dalam lemari es pada suhu 5⁰C selama 10 menit. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan pembekakan sel sehingga kromosom lebih mudah diamati karena kromosom mengkerut dan memendek. Setelah itu akar bawang merah dicuci dengan aquades lalu dimasukkan ke dalam larutan fiksatif famers dan disimpan dalam lemari es pada suhu 5⁰C selama 15 menit. Perlakuan ini berfungsi untuk mempertahankan kondisi jaringan agar sel tidak mengalami perubahan ukuran dan bentuk.

Selanjutnya potongan akar dicuci kembali dengan aquades agar bahan fiksatif hilang kemudian diwarnai dengan pewarna *acetoorcein* 1% lalu di masukan kedalam oven selama 15 menit, untuk memberikan warna merah pada kromosom agar mempermudah dalam pengamatan. Setelah selesai pewarnaan, bagian ujung akar ± 1 mm dipotong dan letakkan d atas objek *glass*, kemudian ditetesi pewarna aceto-orcein sebanyak 1-2 tetes. Preparat tersebut dipanaskan dengan cara melewatkan diatas api agar pewarna lebih meresap. Selesai pemanasan, potongan ujung akar ditutup dengan *cover glasss*, kemudian ditekan secara perlahan supaya sel ujung akar umbi bawang merah menyebar.

Preprat yang sudah siap diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Minyak imersi diperlukan untuk pengamatan diatas perbesaran 1000x agar objek pengamatan dalam preparat terlihat jelas. Objek mitosis yang terlihat baik difoto menggunakan kamera digital.

7. Pengamatan Preparat Mitosis

Pengamatan mitosis pada sediaan dilakukan pada 10 kali bidang pandang untuk setiap preparat. Penentuan bidang pandang pada sediaan dilakukan dengan menggeser secara perlahan ke arah vertikal dan horizontal setiap kali akan berpindah objek pandang.

E. Parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati adalah :

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 saat 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

Kelainan mitosis yang terjadi diamati dengan membandingkan tahapan sel mitosis normal pada kontrol. Kelainan mitosis yang terjadi difoto dengan kamera digital.