

BAB III

PROSEDUR PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Sugiyono (2017: 72) “Metode penelitian eksperimen adalah metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendalikan”. Metode ini digunakan karena penelitian dilakukan di laboratorium dan terdapatnya perlakuan (*treatment*) terhadap objek penelitian.

Adapun desain eksperimen yang digunakan adalah *true experimental* (eksperimen yang sesungguhnya). Desain *true experimental* digunakan karena dalam penelitian peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang memengaruhi jalannya eksperimen sehingga validitas internal (kualitas pelaksanaan rancangan penelitian) dapat menjadi tinggi. Sebagaimana menurut Sugiyono (2017:75) “Desain *true experimental* merupakan penelitian eksperimen dengan sampel diambil secara acak dan terdapat kelompok pembandingan atau kelompok kontrol”.

Pada penelitian ini dilakukan lima perlakuan termasuk didalamnya satu kontrol dan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali ulangan dengan perhitungan mengacu pada patokan jumlah ulangan dan perlakuan yang dikemukakan oleh Hanafiah, (Hernawan, 2018: 7) “Jumlah ulangan dalam penelitian dianggap telah cukup baik bila memenuhi persamaan $(t - 1)(r - 1) \geq 15$, dengan jumlah $t =$ perlakuan dan $r =$ ulangan”.

Untuk menentukan jumlah ulangan (replikasi) dalam melakukan penelitian ini, dapat dihitung sebagai berikut :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$4 (r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5$$

sehingga dalam penelitian ini dibutuhkan 25 percobaan.

B. Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini, terdapat dua variabel yang diteliti, yaitu:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu perlakuan kolchisin dengan konsentrasi yang berbeda, yakni konsentrasi 0 ppm/kontrol (A), konsentrasi 25 ppm (B), konsentrasi 50 ppm (C), konsentrasi 75 ppm, dan (D) konsentrasi 100 ppm (E).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu indeks mitosis bawang merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*).

C. Populasi dan Sampel

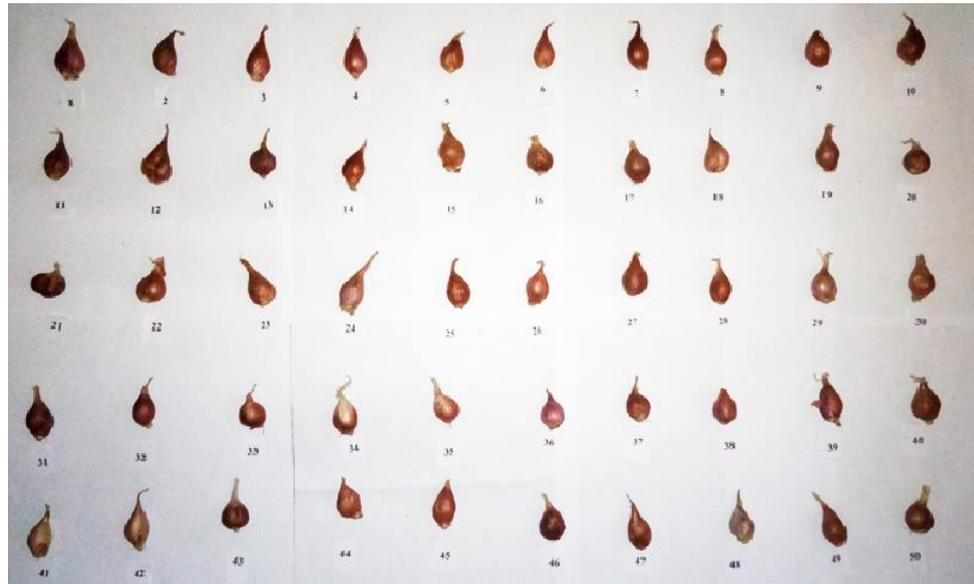
1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah 50 umbi bawang merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*). Bawang merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*) yang dianggap homogen yaitu yang memiliki massa umbi 2,5 – 3,5 gram dengan usia umbi 60 hari. Populasi umbi yang memiliki massa 2,5 – 3,5 gram dapat dilihat pada Gambar 3.1. Sedangkan populasi umbi bawang merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*) yang telah dinomori dapat dilihat Gambar 3.2.



Sumber : Dokumentasi Penulis

Gambar 3.1
Populasi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*) Bermassa 2,5 – 3,5 Gram



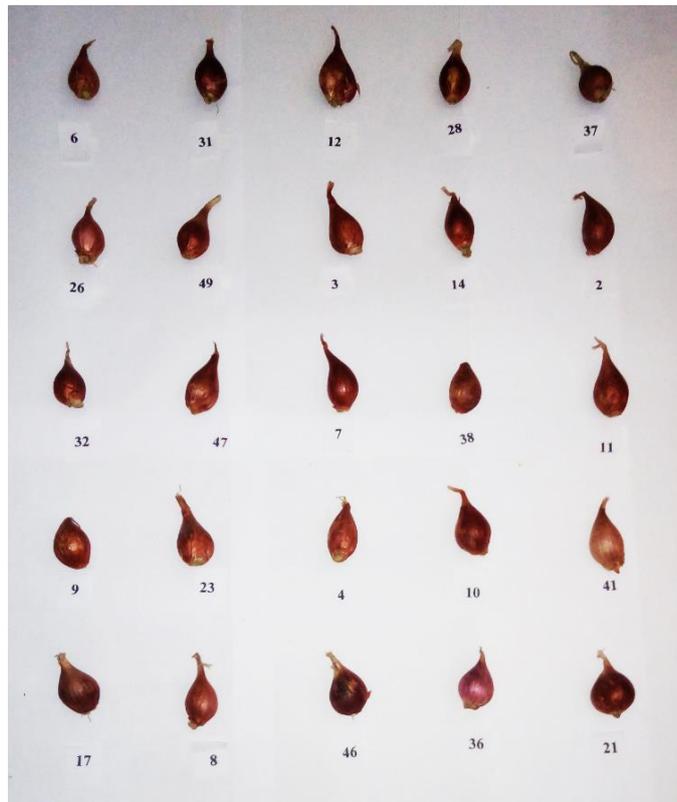
Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.2
**Populasi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*)
 yang Telah dinomori**

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini dipilih dengan menggunakan teknik *simple random sampling*. Menurut Sugiyono (2017:82) “*Simple random sampling* digunakan apabila anggota populasi dianggap homogen dan pengambilan anggota sampel dari populasi dilakukan secara acak...”.

Sampel yang akan dipilih adalah 25 umbi bawang merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*) yang dianggap homogen dengan massa umbi 2,5 – 3,5 gram dan usia umbi 60 hari. Sampel dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.3
Sampel Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*)

D. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan lima kali ulangan. Menurut Sudjana (Hernawan, 2018: 16) "Desain RAL digunakan jika perlakuan dikenakan sepenuhnya secara acak kepada unit-unit eksperimen, sehingga RAL tidak terdapat batasan terhadap pengacakan". Lebih lanjut, menurut Hernawan, (2018: 17) "RAL merupakan rancangan yang paling sederhana dan hanya digunakan jika seluruh satuan percobaan bersifat homogen serta dilakukan pada percobaan laboratorium atau dalam percobaan tertentu yang

memiliki sifat relatif homogen”. Bahkan Vincent (Hernawan, 2018: 17) “RAL dilakukan apabila jumlah perlakuan terbatas”.

Sesuai dengan masalah yang diteliti, maka untuk memudahkan dalam penelitian ini ditetapkan lima perlakuan penelitian. Kelima perlakuan tersebut yaitu kolkhisin 0 ppm/kontrol (A), pemberian konsentrasi kolkhisin 25 ppm (B), 50 ppm (C), 75 ppm (D) dan 100 ppm (E). Setelah perlakuan diberikan, maka hasil kelima perlakuan tersebut dihitung indeks mitosisnya (jumlah profase, metafase, anafase, dan telofase dibagi 100), sehingga diperoleh indeks mitosis dari kelima perlakuan tersebut.

E. Langkah-Langkah Penelitian

Secara umum penelitian ini terdiri dalam empat tahap, yaitu :

1. Tahap persiapan, yang meliputi :

- a. mendapatkan Surat Keputusan Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi mengenai penetapan pembimbing skripsi pada tanggal 6 September 2018;
- b. mengonsultasikan judul dan permasalahan yang akan diteliti dengan pembimbing I dan II pada tanggal 24 September 2018;
- c. mengajukan judul ke Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) pada tanggal 23 Oktober 2018;
- d. menyusun proposal penelitian dengan dibimbing oleh pembimbing I dan II untuk diseminarkan pada tanggal 11 November 2018;
- e. mengajukan permohonan seminar proposal penelitian kepada Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) pada tanggal 8 Februari 2019;

- f. melaksanakan seminar proposal penelitian sehingga dapat tanggapan, saran, koreksi atau perbaikan proposal penelitian pada tanggal 19 Maret 2019;
- g. mengonsultasikan dengan pembimbing I dan II untuk memperbaiki proposal penelitian pada tanggal 20 Maret 2019.

2. Tahap pelaksanaan, yang meliputi:

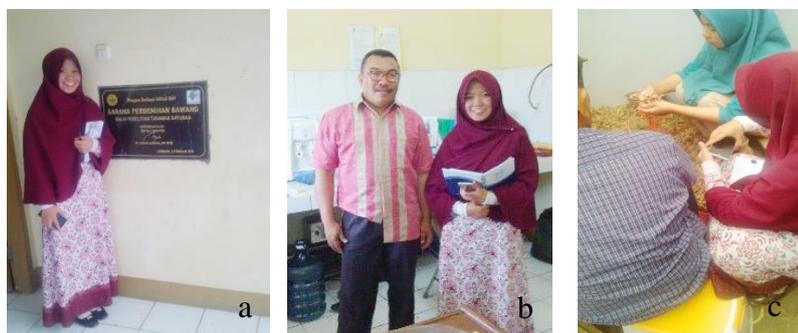
a. Persiapan Alat dan Bahan

- 1) Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop (Olympus CX-21), kamera optilab, neraca digital, laptop (Samsung), *hotplate* (Daiki), gelas kimia (Schott Duran), tabung ukur (Pyrex Iwaki), pipet tetes, pipet hisap (Brand-W-Germany), *microtube* (Kartel), kanebo, wadah *styrofoam*, undian, silet (Tiger) dan corong kaca. Gambar alat dapat dilihat pada Lampiran 2.
- 2) Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bawang merah varietas *Bima Brebes* yang diperoleh dan tersedia di Balitsa yang memiliki keseragaman tinggi dengan usia umbi 60 hari dan massa umbi 2,5 – 3,5 gram, larutan kolkhisin (CV. Indo Biotech Agro), larutan asam asetat glasial 45%, larutan HCl 1N, larutan asetokarmin 2%, gliserin, akuades, kaca objek, kaca penutup, tusuk gigi, es batu, dan cat kuku transparan. Gambar bahan dapat dilihat pada Lampiran 2.

b. Prosedur Kerja

1) Survei dan Pengambilan Umbi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*)

Bawang merah yang digunakan adalah bawang merah yang tersedia di Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran (Balitsa) Lembang Bandung dan terdistribusi paling banyak di wilayah Tasikmalaya. Bawang merah tersebut didapatkan dengan beberapa tahap, yakni: survei lokasi, wawancara dengan peneliti bidang pemuliaan tanaman, pengambilan bawang merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*) yang telah dipanen bulan sebelumnya dan tersimpan di gudang (Gambar 3.4).



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.4

Survei dan Pengambilan Umbi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*): a) Survei lokasi perbenihan bawang merah, b) Wawancara dengan peneliti bidang pemuliaan tanaman, c) Pengambilan umbi bawang merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*)

2) Pembuatan Kemikalia

a) Pembuatan Larutan Kolkhisin

Pada dasarnya kolkhisin yang digunakan dalam penelitian ini bertujuan untuk memudahkan proses pengamatan dan meminimalisasi biaya bahan praktikum, agar nantinya dapat diaplikasikan di sekolah, maka konsentrasi kolkhisin yang digunakan cukup rendah. Hal tersebut dikarenakan kolkhisin yang tersedia dipasaran hanya berkonsentrasi 100 ppm (Gambar 3.5). Dengan demikian penelitian ini menggunakan konsentrasi 0 ppm/kontrol, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, dan 100 ppm. Konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, dan 75 ml dibuat melalui pengenceran (Gambar 3.6.b), sedangkan konsentrasi 100 ppm tidak memerlukan pengenceran.



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.5
Kolkhisin Konsentrasi 100 ppm

Setiap perlakuan dalam setiap ulangan, larutan kolkhisin yang telah dilakukan pengenceran sesuai dengan kebutuhan penelitian hanya dibutuhkan sebanyak 1 ml. Jika pengamatan dilakukan dengan lima perlakuan dan lima kali ulangan maka kolkhisin yang telah dilarutkan dengan konsentrasi yang berbeda dibutuhkan sebanyak 25 ml. Pengenceran kolkhisin konsentrasi 100 ppm menjadi 25 ppm, 50 ppm dan 75 ppm mengacu pada rumus pengenceran yang dikemukakan oleh Mardiah (2010), yakni:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan:

V_1 = volume larutan asal

M_1 = konsentrasi larutan asal

V_2 = volume hasil pengenceran

M_2 = konsentrasi hasil pengenceran

(1) Membuat larutan konsentrasi 25 ppm sebanyak 10 ml dari kolkhisin 100 ppm.

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 = 10 \times 25$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$

Jumlah volume kolkhisin 100 ppm yang diperlukan adalah 2,5 ml. Kolkhisin ditambah dengan akuades hingga volumenya menjadi 10 ml.

(2) Membuat larutan konsentrasi 50 ppm sebanyak 10 ml dari kolkhisin 100 ppm.

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 = 10 \times 50$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

Jumlah volume kolkhisin 100 ppm yang diperlukan adalah 5 ml. Kolkhisin ditambah dengan akuades hingga volumenya menjadi 10 ml.

- (3) Membuat larutan konsentrasi 75 ppm sebanyak 10 ml dari kolkhisin 100 ppm.

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 = 10 \times 75$$

$$V_1 = 7,5 \text{ ml}$$

Jumlah volume kolkhisin 100 ppm yang diperlukan adalah 7,5 ml. Kolkhisin ditambah dengan akuades hingga volumenya menjadi 10 ml.



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.6
Pengenceran Larutan Kolkhisin: a) Pengenceran larutan kolkhisin 100 ppm dengan akuades, b) Kolkhisin setelah pengenceran

b) Pembuatan Larutan Asam Asetat Glasial 45%

Larutan asam asetat glasial dibuat dengan mencampurkan 45 ml asam asetat glasial dalam 55 ml akuades (Gambar 3.7).



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.7

Pembuatan Asam Asetat Glasial 45%: a) Pengambilah 45 ml asam asetat glasial 100%, b) Penambahan 55 ml akuades, c) Penambahan akuades hingga larutan hingga 100 ml, d) Asam asetat glasial 45%

c) Pembuatan HCl 1N

Membuat larutan HCl konsentrasi 1 N sebanyak 30 ml dari HCl 11,7 N (Gambar 3.8).

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 11,7 = 30 \times 1$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$

Jumlah volume HCl 11,7 N yang diperlukan adalah 2,5 ml. HCl ditambah dengan akuades hingga volumenya menjadi 30 ml.



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.8

Pembuatan Larutan HCl 1 N: a) Pengenceran HCl 11,7 N dengan menambahkan akuades, b) HCl setelah pengenceran

d) Pembuatan Asetokarmin 2%

Asam asetat glasial 45 ml dipanaskan hingga hampir mendidih (90-100°C), ditambah 2 gram asetokarmin, selanjutnya didinginkan pada suhu kamar. Asetokarmin yang telah didinginkan kemudian ditambah 55 ml akuades dan diaduk hingga larut kemudian disaring dan disimpan dalam

botol tertutup berwarna gelap pada suhu kamar. Pembuatan asetokarmin dapat dilihat pada Gambar 3.9



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.9

Pembuatan Larutan Asetokarmin: a) Pemanasan asam asetat, b) Pelarutan serbuk karmin, c) Penyaringan asetokarmin, d) Asetokarmin

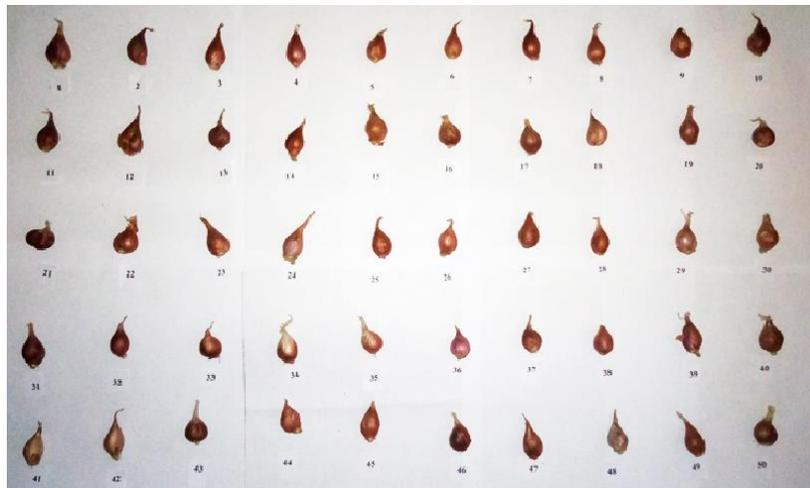
- 3) Pemilihan 50 Umbi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*) yang Homogen (memiliki massa 2,5 – 3,5 gram) untuk dijadikan Populasi (Gambar 3.10).



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.10
Pemilihan 50 Umbi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*) yang Memiliki Massa ± 3 Gram

- 4) Menentukan 25 Sampel dari 50 Populasi dengan Cara:
- (a) populasi sebanyak 50 umbi diberi label nomor 1 sampai dengan 50,



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.11
Penomoran Populasi

- (b) membuat gulungan kertas untuk nomor populasi sebanyak 50 buah kemudian diberi nomor 1-50 lalu dimasukkan ke dalam gelas, dan

(c) mengocok gelas yang berisi gulungan kertas tadi, jika yang keluar kertas nomor 1, maka umbi bawang merah nomor 1 diambil dan digunakan sebagai sampel, demikian seterusnya hingga didapatkan sampel sebanyak 25 umbi bawang merah. Gambar sampel dapat dilihat pada Gambar 3.3. Adapun nomor sampel yang keluar adalah:

6	31	12	28	37
26	49	3	14	2
32	47	7	38	11
9	23	4	10	41
17	8	46	36	21

5) Menentukan Nomor Umbi Bawang yang diberi Perlakuan Secara Acak

Pada percobaan ini dibutuhkan 25 percobaan dengan kombinasi 5x5, karena dalam percobaan ini akan digunakan lima perlakuan dan lima kali ulangan. Maka dari 25 umbi bawang sampel dilakukan pengacakan terhadap perlakuan dan ulangan. Pengacakan untuk pemberian konsentrasi kolkhisin dan ulangan dilakukan dengan cara:

- (a) membuat 25 gulungan kertas kecil yang berukuran sama, kertas tersebut diberi nomor yang keluar sesuai randomisasi pemilihan sampel.

- (b) membuat 25 gulungan kertas kecil yang berukuran sama, lima buah diberi tanda A (untuk perlakuan A), lima buah diberi tanda B (untuk perlakuan B), lima buah diberi tanda C (untuk perlakuan C), lima buah diberi tanda D (untuk perlakuan D), dan lima buah diberi tanda E (untuk perlakuan E) kemudian memasukkannya ke dalam sebuah gelas;
- (c) gelas (pada poin 1 dan 2) dikocok secara bersamaan;
- (d) dari gelas tersebut dikeluarkan satu gulungan kertas. Misalnya pada pengocokan pertama dari gelas (1) keluar kertas bernomor 2, dari gelas (2) keluar kertas bertanda A, maka umbi bawang merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*) dengan nomor 2 harus diberi perlakuan A. Demikian seterusnya sampai seluruh perlakuan dan ulangan percobaan terisi dengan perlakuan secara acak. Adapun nomor sampel dan jenis perlakuan yang keluar adalah:

6E	31E	12B	28E	37E
26B	49A	3D	14E	2A
32A	47D	7C	38B	11A
9A	23C	4B	10D	41D
17B	8C	46D	36C	21C

6) Pengakaran Umbi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*)

Pada tahap pengakaran, dua puluh lima sampel yang terpilih sebelumnya tidak diakarkan secara bersamaan, namun

dari satu perlakuan (misal perlakuan kontrol) ke perlakuan yang lain (misal pemberian kolkhisin 25 ppm) dilakukan pada hari yang berbeda. Meskipun demikian, waktu pemetongan ujung akar tetap dilakukan pada jam yang sama. Hal tersebut dikarenakan tidak memungkinkannya pengamatan fase mitosis pada semua perlakuan dapat dilakukan dalam waktu sehari. Jika pengamatan sel dilakukan selama beberapa hari maka preparat berpotensi mengalami penurunan dalam segi kualitasnya.

Pengakaran umbi bawang merah dilakukan pada medium lembab kanebo basah selama ± 4 hari. Adapun langkah-langkah pengakaran adalah sebagai berikut:

- a) Kanebo dibasahi dan disimpan pada wadah plastik



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.12
Pembasahan Kanebo

- b) Umbi disimpan pada wadah plastik dan disungkup menggunakan *polybag* selama ± 1 hari. Setelah sehari sungkupan umbi dibuka dan disimpan kembali selama 2 hari. Selain itu, dilakukan pengontrolan setiap harinya untuk

memastikan terjaga dari organisme lain. Gambar pengakaran dapat dilihat pada Gambar 3.13.



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.13
Pengakaran Bawang Merah: a) Pengakaran hari ke-1, b) Penyungkupan, c) Pengakaran hari ke-4

7) Pemotongan Akar

Pemotongan akar dilakukan pada pagi hari, yakni pada pukul 08.00 WIB. Pukul 08.00 WIB merupakan waktu ketika bawang merah (*Allium ascalonicum*) sedang bermitosis (Tyas, 2014:238). Akar dipotong sepanjang ± 1 cm dari ujung akar menggunakan silet (Gambar 3.14).



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.14
Pemotongan Akar Bawang Merah (*Allium ascalonicum* var. *Bima Brebes*)

Pemotongan akar sepanjang ± 1 cm bertujuan untuk memudahkan proses pengambilan cuplikan pada saat proses preparasi mitosis dan menjaga sel agar tidak terkoyak pada saat fiksasi, maserasi dan pencucian akuades. Akar ± 1 cm tersebut akan mengalami pemotongan lagi sebelum tahap pemencetan. Hal tersebut disebabkan karena bagian akar yang digunakan untuk dijadikan preparat hanya bagian yang masih bersifat meristematik yaitu $\pm 2-3$ mm (Aristya, *et.al.*, 2015: 56).

8) Pembuatan Preparat

Preparat dibuat dengan metode *squash* sebagai berikut:

(a) Praperlakuan

Praperlakuan dilakukan setelah ujung akar tanaman dipotong sepanjang ± 1 cm, kemudian cuplikan akar direndam pada kolkhisin dengan konsentrasi berbeda-beda yakni 0 ppm/kontrol, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, dan 100 ppm. Perendaman menggunakan kolkhisin bertujuan untuk mengondensasikan kromosom (Koyani dan Saiyad, 2011: 177). Lama perendaman kolkhisin dilakukan selama satu jam, meskipun dalam referensi perendaman kolkhisin dilakukan selama 2-4 jam, namun hal tersebut akan menyita waktu jika diaplikasikan di sekolah, sehingga waktu 1 jam dirasa cukup untuk pengondensasian kromosom (Gambar 3.15).



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.15
Perendaman Akar dengan Kolkhisin

Setelah direndam cuplikan akar dicuci sebanyak tiga kali menggunakan akuades (Gambar 3.16);



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.16
Pencucian menggunakan Akuades

(b) Fiksasi

Fiksasi menggunakan larutan asam asetat glasial 45% yang merupakan campuran 45 ml asam asetat glasial dalam 55 ml akuades. Tahap fiksasi bertujuan untuk

menghentikan aktivitas sel secara paksa dengan cara merusak protein dan asam nukleat (Setyawan dan Sutikno, 2000:23). Kromosom yang telah difiksasi akan mengerut, mengeras, dan mengendap serta tetap berada di posisi semula ketika masih hidup (Aristya, *et.al.*, 2015: 56). Lebih lanjut, fiksasi dapat meningkatkan indeks bias sehingga memperjelas kromosom saat diamati di bawah mikroskop dan mengakibatkan daya serap sel terhadap pewarna menjadi cepat (Aristya, *et.al.*, 2015:56).

Adapun suhu yang digunakan untuk fiksasi sel adalah 4⁰C (Aristya, *et.al.*, 2015:56). Waktu yang diperlukan untuk fiksasi selama 15 menit. (Gambar 3.17).



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.17
Tahap Fiksasi

Rendahnya suhu bertujuan untuk menghambat kerja enzim-enzim penghidrolisis sel (Musyarifah dan Agus, 2018: 445). Selanjutnya setelah proses fiksasi selesai,

cuplikan akar kemudian dicuci lagi menggunakan akuades sebanyak tiga kali.

(c) Maserasi.

Tahap maserasi menggunakan Asam klorida (HCl) 1 N (5 ml HCl pekat dalam 55 ml akuades) pada suhu 55°C selama 5 menit (Gambar 3.18). Maserasi bertujuan untuk meluruhkan lamela tengah pada dinding sel (Aristya, *et.al.*, 2015:56). Menurut Setyawan dan Sutikno (2000:23), “Maserasi yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan daya serap pewarna terhadap kromosom dan menyebabkan kromosom terurai karena protein dan asam nukleatnya rusak”. Setelah tahap maserasi selesai, cuplikan akar dicuci menggunakan akuades sebanyak tiga kali;



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.18
Tahap Maserasi

(d) Pewarnaan

Pewarnaan dilakukan dengan cara cuplikan akar direndam pada pewarna asetokarmin 2% pada suhu kamar selama 1 jam (Gambar 3.19). Pewarnaan bertujuan untuk

memberi kontras warna dan kejelasan preparat (Izzati, 2017: 3).



Sumber: Dokumentasi Penulis

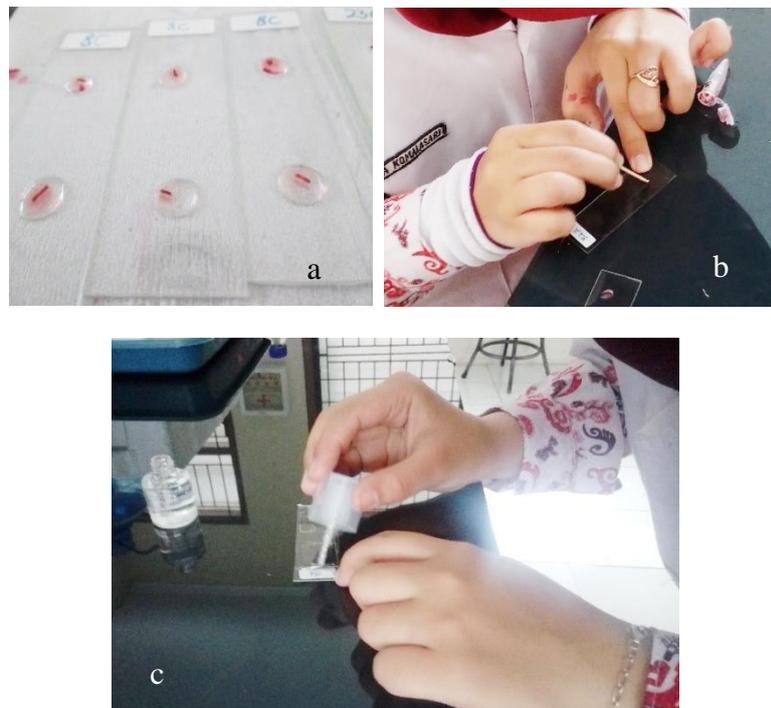
Gambar 3.19
Tahap Pewarnaan

(e) *Squashing*/pemencetan

Cuplikan akar dipotong hingga menyisakan ujung akar yang berwarna gelap (bagian meristematik) sepanjang $\pm 2 - 3$ mm dan diletakkan pada kaca objek menggunakan tusuk gigi. Selanjutnya cuplikan ditetesi dengan gliserin 1 tetes dan ditutupi dengan kaca penutup. Penetesan gliserin bertujuan untuk memudahkan proses pemencetan, dan mempertahankan preparat dalam keadaan basah karena jika kering preparat akan rusak (Aristya, *et.al.*, 2015: 57).

Selanjutnya setelah preparat ditutup dengan kaca penutup, preparat dipencet secara merata dengan menggunakan tusuk gigi. Pemencetan pada sel bertujuan untuk menipiskan sel dan agar sel menyebar (Mulisyah *et.al.*, 2014: 50). Setelah itu disemua sisi kaca penutup

diolesi dengan cat kuku transparan agar preparat tidak bergeser (Aristya, *et.al.*, 2015: 57). Proses pemotongan akar hingga pengolesan cat kuku dapat dilihat pada Gambar 3.20.



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.20
Tahap *Squashing*; a) Penetesan Gliserin b) *Squashing* menggunakan tusuk gigi c) Pengolesan tepi *cover glass* dengan cat kuku transparan

9) Pengamatan Fase Mitosis

Pengamatan dilakukan mulai jam 12.30 WIB setelah semua tahapan preparasi fase mitosis (praperlakuan, fiksasi, maserasi, pewarnaan, dan pemencetan/*squashing*) selesai dilakukan. Fase mitosis bawang merah (*Allium ascalonicum*) berlangsung selama beberapa jam dengan lama pembelahan pada setiap fasenya, yaitu profase selama 71 menit, metafase 6,5 menit,

anafase 2,4 menit, dan telofase 3,8 menit (Syukur dan Sastrosumarjo, 2015: 67) dengan fase pembelahan (fase M) dimulai pada pukul 08.00 WIB (Tyas, 2014: 238).

Meskipun pengamatan fase mitosis dilaksanakan pada pukul 12.30 WIB, sementara fase mitosis hanya terjadi beberapa jam, maka hal tersebut tidak akan berpengaruh terhadap fase-fase mitosis pada preparat yang diamati. Hal tersebut terjadi karena sel telah berhenti beraktivitas dengan adanya tahap pemotongan akar yang merupakan tahap awal sebelum preparasi mitosis, kemudian adanya tahap praperlakuan menggunakan kokhisin yang mengondensasikan kromosom, serta adanya tahap fiksasi, yakni perendaman akar menggunakan asam asetat glasial 45% yang menyebabkan sel mengalami kematian, pengawetan, dan membuat kondisi sel semaksimal mungkin mendekati keadaan waktu sel masih hidup (Aristya, *et.al.*, (2015: 56).

Pengamatan fase mitosis dilakukan dengan menggunakan mikroskop Olympus CX-21 yang terhubung dengan kamera optilab. Kamera optilab tersebut terhubung dengan laptop yang dilengkapi *software optilab viewer 3.0* dan *image raster 2.1*. Pengamatan dilakukan pada pembesaran 10x lensa objektif dan lensa okuler, setelah sel teramati dengan jelas dan diperkirakan ada 100 sel pada pembesaran 10x objektif maka gambar dipotret dengan menggunakan optilab dan bantuan *software optilab*

viewer. Selain itu dilakukan pemotretan pada pembesaran 40x lensa objektif dan 10x lensa okuler untuk mendapatkan gambar tahap profase, metafase, anafase, dan telofase lebih jelas. Selanjutnya gambar hasil pemotretan ditandai menggunakan *software image raster 2.1* sebanyak 100 sel secara tersusun. Pengamatan fase mitosis dapat dilihat pada Gambar 3.20



Sumber: Dokumentasi Penulis

Gambar 3.21
Pengamatan Fase Mitosis

Sel yang telah ditandai sebanyak 100 sel kemudian dihitung jumlah fase mitosisnya (profase, metafase, anafase, dan telofase). Setelah jumlah total fase mitosis didapatkan kemudian dihitung indeks mitosisnya. Meskipun pada saat pengamatan hanya ditemukan satu fase saja (profase saja misalnya), maka hal tersebut tetap disebut sebagai indeks mitosis, dan pada tabel pengamatan kolom metafase, anafase, dan telofase diisi dengan angka 0 (nol) (Itoyama, *et.al.*, 1997). Perhitungan jumlah fase mitosis pada setiap preparat dilakukan selama satu minggu setelah gambar hasil pemotretan diambil.

3. Tahap Pelaporan

Tahap pelaporan dilakukan mulai dari minggu ke-3 setelah perhitungan indeks mitosis yaitu dengan mengolah data hasil observasi dibantu dengan menggunakan program aplikasi SPSS 25.

F. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini adalah dengan cara observasi. Observasi dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel yang sedang berada pada fase pembelahan baik profase, metafase, anafase maupun telofase pada perbesaran 400 kali. Observasi ini dilakukan pada hari ketika pembuatan preparat selesai dilakukan. Total sel yang diamati dalam satu preparat mengacu pada Sethi dan Rath (2017: 12), yakni 100 sel.

Data dari setiap preparat dihitung indeks mitosisnya dengan rumus:

$$MI = \frac{\text{prophase} + \text{metaphase} + \text{anaphase} + \text{telophase}}{\text{Total Number of Cell}} \times 100$$

Keterangan:

Total Number of Cell = Total sel yang diamati (100 sel)

G. Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa tabel hasil pengamatan dan setiap kolomnya diisi dengan angka 0 – 100 sesuai dengan jumlah sel yang mengalami fase mitosis pada total 100 sel yang diamati dengan format sebagaimana yang terdapat pada Tabel 3.1 berikut:

Tabel 3.1
**Instrumen Pengamatan Sel yang Mengalami
 Pembelahan**

Perlakuan	Ulangan	Fase Mitosis				Total
		P	M	A	T	
Kolkhisin 0 ppm/kontrol	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Kolkhisin 25 ppm	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Kolkhisin 50 ppm	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Kolkhisin 75 ppm	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Kolkhisin 100 ppm	1					
	2					
	3					
	4					
	5					

Keterangan:

- P : Profase
- M : Metafase
- A : Anafase
- T : Telofase

H. Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Setelah data dari penelitian diperoleh, maka data tersebut dianalisis dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Uji Normalitas

Untuk mengetahui normalitas data digunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Jika kedua kelompok data telah diambil dari populasi yang berdistribusi normal, maka analisis dilanjutkan dengan uji homogenitas, tetapi jika salah satu atau kedua kelompok data telah diambil dari populasi yang tidak berdistribusi normal, maka analisis dilakukan dengan uji statistika non parametrik yaitu menggunakan uji U Mann-Whitney.

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas varians dengan menggunakan uji *Levene*. Jika kedua kelompok data variansnya yang homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji ANOVA, tetapi jika kedua kelompok data mempunyai varians yang tidak homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik. Analisis data pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif dan kuantitatif, yaitu dengan cara menguraikan hasil penelitian berdasarkan data yang diperoleh secara menyeluruh. Analisis statistik dilakukan dengan ANOVA untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antarperlakuan. Apabila terdapat perbedaan, selanjutnya dianalisis menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf

5% atau disebut juga dengan *Least Significant Difference Test Methode* (LSD).

I. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu

Waktu pelaksanaan penelitian ini dilaksanakan selama 8 bulan sejak September 2018 sampai dengan April 2019, seperti yang terdapat pada Tabel 3.2.

2. Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Botani, Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi, Tasikmalaya.

