

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan manipulasi terhadap objek penelitian serta terdapat kontrol (Nazir, 2003: 63).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dalam penelitian ini digunakan lima perlakuan yaitu dengan nilai EC₉₀, EC₇₀, EC₅₀, EC₃₀, EC₁₀ dan sebagai kontrol adalah *A. cepa* yang tidak diberi perlakuan kromium tetapi akuades. Pengulangan dilakukan sebanyak lima kali berdasarkan Gomez & Kwanchai (1995: 8) menggunakan rumus sebagai berikut:

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4 \sim 5$$

Keterangan :

t (treatment) = jumlah perlakuan

r (replication) = jumlah pengulangan

15 = derajat bebas untuk RAL

Desain plot penelitian ini adalah :

C3	E1	B4	B2	A5
K1	K2	B5	K4	E3
C2	K3	D5	C4	C5
A1	A2	D4	D2	E2
D3	E5	D1	B3	A3
B1	C1	A4	E4	K5

Keterangan :

K : kontrol

A : EC₉₀

B : EC₇₀

C : EC₅₀

D : EC₃₀

E : EC₁₀

Jumlah preparat yang dibuat berdasarkan lima kali ulangan dan lima perlakuan ditambah kontrol adalah 30 buah preparat.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini ialah semua *A. cepa* dengan diameter ± 2 cm, sedangkan yang menjadi sampel ialah individu *A. cepa* yang dibuat dalam preparat, dimana preparat tersebut harus mengandung tidak kurang dari 500 sel yang berada pada tahap mitosis.

D. Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Struktur Tumbuhan Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 3.1) adalah sebagai berikut :

Tabel 3.1 Alat yang digunakan

No.	Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Botol vial		35 buah

2.	Staining jar		6 buah
3.	Kaca penutup		2 box
4.	Gelas kaca		2 box
5.	Lemari es	Toshiba	1buah
6.	Water bath	Eyela	1buah
7.	Gelas Ukur	Pyrex	1buah
8.	Timbangan digital analitik	HF-100	1buah
9.	Mikroskop elektrik	Shimadzu	1buah

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian (Tabel 3.2) adalah sebagai berikut :

Tabel 3.2 Bahan yang digunakan

No.	Bahan	Jumlah	Keterangan
1.	<i>Allium cepa</i>	5 kg	Diperoleh dari Pasar Ciroyom, Bandung, bawang berasal dari Brebes
2.	Kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$),	± 3 gram	Kualitas bahan : pa
3.	Alkohol 100%	± 300 ml	Digunakan untuk fiksasi dan dehidrasi
4.	Asam asetat glasial	± 100 ml	Digunakan untuk fiksasi
5.	Pewarna Schiff's	50 ml	Digunakan untuk pewarnaan

	reagent		kromosom
6.	HCL 4%,	50 ml	Digunakan untuk melunakan akar
7.	Akuades	10 liter	Sebagai pelarut
8.	Xilol	secukupnya	Digunakan sebagai <i>clearing</i>
9.	Dry es	1 balok	Untuk merekatkan objek pada gelas kaca
10.	Entelan	secukupnya	Digunakan sebagai perekat untuk menutup kaca penutup

F. Langkah Kerja

1. Uji Toksisitas Kromium

Langkah kerja pengujian dilakukan berdasarkan Julkipli (2005). *A. cepa* ditumbuhkan akarnya pada gelas plastik yang berisi bahan uji dengan konsentrasi 80 ppm, 70 ppm, 60 ppm, 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, 10 ppm dan aquades sebagai kontrol. Untuk menumbuhkan akar, maka disimpan di tempat gelap selama lima hari. Pada hari ke lima panjang akar *A. cepa* dihitung dan pertumbuhan akar yang paling pendek dari masing-masing seri tidak diperhitungkan. Selanjutnya dicari nilai konsentrasi penghambatan pertumbuhan

(EC: *effective concentration*), diinterpolasikan dari panjang akar (Y) sebagai persen pertumbuhan dari kontrol, terhadap log konsentrasi larutan uji (X).

2. Uji Genotoksisitas Kromium

Uji genotoksisitas didasarkan pada nilai EC yang diperoleh pada uji toksisitas. *A. cepa* ditumbuhkan akarnya pada kontrol selama dua hari. Setelah dua hari, umbi dengan pertumbuhan akar terpendek dari masing-masing seri dibuang. Sisanya ditumbuhkan pada seri bahan uji dalam gelas plastik dan dipaparkan selama 24 jam terhadap bahan uji dan kontrol. Setelah pemaparan selesai, akar *A. cepa* dipanen dan dibuat preparat *squash*.

3. Pembuatan Preparat *Squash*

Metode pembuatan preparat *squash* yang meliputi proses fiksasi dan pewarnaan dilakukan berdasarkan metode Fuelgen (Ukaegbu & Odeigah, 2009). Metode secara rinci dijelaskan sebagai berikut:

a. Fiksasi

Fiksasi dilakukan dengan cara ujung akar dipotong sepanjang 1 cm menggunakan pisau tajam. Ujung akar yang telah dipotong dimasukan ke dalam 2ml larutan farmer (3 alkohol : 1 asam asetat glasial). Bahan ini disimpan di

dalam freezer (4°C) dengan masa penyimpanan minimal 24 jam dan maksimal dapat hingga 2 bulan.

b. Pewarnaan dengan menggunakan metode Fuelgen

Setelah fiksasi, larutan farmer kemudian dibuang dan dicuci dengan air keran sebanyak 8 kali, ditambahkan 1 ml 1 N HCl dan disimpan pada suhu ruang selama 3 menit. Botol vial berisi akar dipindahkan ke dalam *waterbath* 60°C selama 8 menit dan botol vial dibuka tutupnya. HCl dibuang dan akar dalam botol dicuci dengan air keran sebanyak 8 kali. Ke dalam botol ditambahkan 1 ml Schiff's reagen dan disimpan di ruang gelap selama 1 jam. Setelah itu akar dicuci dengan air keran sebanyak 3 kali dan ditambahkan asam asetat 45% sebanyak 1 ml. Botol dapat disimpan selama 2 hari pada suhu 4°C sebelum masuk ke tahapan berikutnya. Tahap selanjutnya adalah pembuatan preparat. Kaca objek untuk setiap konsentrasi bahan uji diberi kode, setelah itu ditetesi dengan 1 tetes asam asetat 45% di atasnya. Ujung akar dipotong sepanjang 2 mm dan sel-sel dipisahkan dengan cara di *squash* yaitu dengan mengetuk-ngetuk kaca penutup dengan ujung jari. Setelah di *squash* preparat disimpan di atas *dry ice* (-70 °C) selama 3-5 menit atau di suhu -20°C selama 30 menit dan kaca penutup dibuka menggunakan pisau tajam secara perlahan kemudian dikeringkan di suhu kamar. Tahap berikutnya adalah dehidrasi dengan merendam preparat pada alkohol bertingkat (25%, 50%, 70%, 85% dan 99,9%) selama masing-masing 10 menit selanjutnya disimpan dalam larutan xilol selama 10 menit. Selama masih basah preparat diberi entelan untuk proses penempelan.

5. Penghitungan

Penghitungan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 x dengan minyak imersi. Aspek yang dihitung adalah jumlah sel yang teramati, jumlah sel tahap mitosis yang tidak kurang dari 500 sel, jumlah sel saat interfase, jumlah sel yang mengalami aberasi kromosom dan jenis aberasi kromosom yang terjadi.

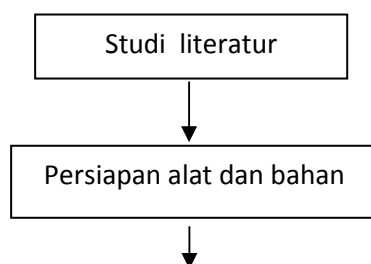
Penghitungan indeks mitosis berdasarkan Fisun & Rasgele (2009) dengan rumus berikut ini:

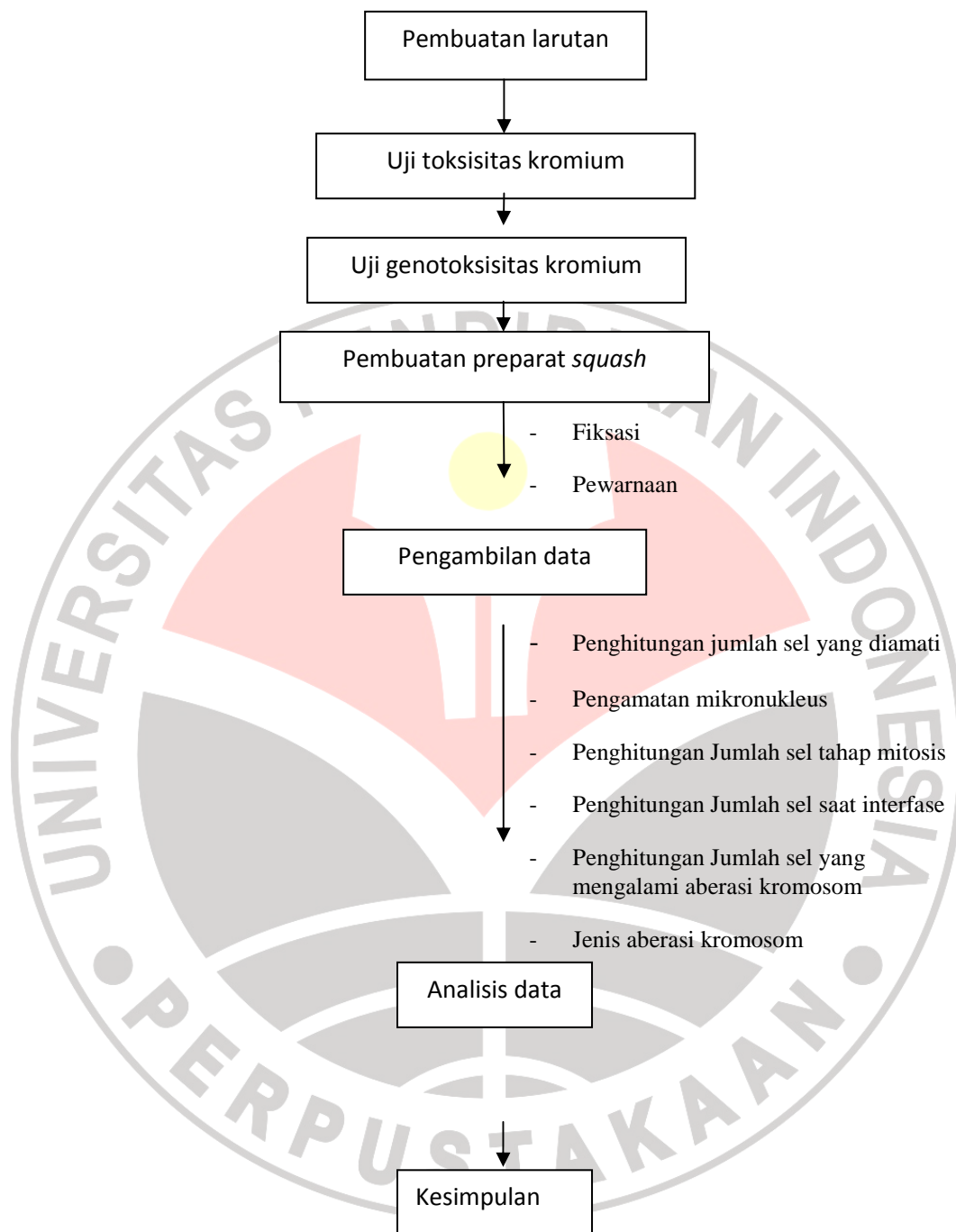
$$\text{Indeks mitosis} = \frac{\Sigma \text{ sel tahap mitosis}}{\Sigma \text{ total sel yang diamati}} \times 100\%$$

G. Pengolahan Data

Hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis statistik. Langkah pertama yang dilakukan yaitu dengan melakukan uji prasyarat yang meliputi dua uji yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Pada uji normalitas digunakan uji Kolmogorov-Smirnov, sedangkan Uji Homogenitas menggunakan Uji Lavene.

Setelah data homogen dan normal, maka dilakukan uji ANOVA satu arah, karena hanya satu variabel yang digunakan yaitu konsentrasi kromium. Pada uji ANOVA H_0 ditolak, artinya ada perbedaan yang signifikan pada setiap perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Tukey untuk mengetahui perbedaan yang signifikan ($\alpha = 0.05$) antar perlakuan.





Gambar 3.1 Bagan alur penelitian