

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan bulan April – Oktober 2007. Dilaksanakan di Rumah Kaca Laboratorium Biologi FKIP UNRI dan Laboratorium Kimia FMIPA UNP.

4.2. Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah gelas kimia 250 ml, Erlenmeyer 250 ml, Erlenmeyer 50 ml, corong pisah 500 ml, corong kerucut, pompa vakum, kertas whatman No 1, glass wool, corong Buchner, labu saring, mortar, rotary evaporator, labu tiga leher, kondensor refluks, penangas air, cawan penguap, labu penampung, oven pengering, tutup karet, kertas saring, thermometer, batu didih, cangkul, polybag ukuran 5 kg, timbangan analitik, penggaris, jangka sorong, kaca objek, kaca penutup, botol placoon, kuas kecil, lampu Bunsen, tisu, mikroskop dan kamera digital.

Bahan-bahan yang gunakan adalah Daun tanaman Tembakau siap panen diperoleh dari petani di desa Taratak, Kubang, kecamatan Guguk Payakumbuh-Sumatera Barat, eter, larutan NaOH 5%, methanol, aquadest, CaCO₃, metilen klorida (CH₂Cl₂), MgSO₄ anhidrat (telah dioven 100⁰C, 1 jam), aseton, petroleum eter / n-heksana, biji Bayam (*Amaranthus tricolor* L), media tanah, pupuk kandang, asam asetat glasial 40%, HCL 0,1 N, dan acetocarmin.

4.3. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen yang disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL), terdiri 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang diberikan yaitu konsentrasi EDT / ekstrak daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L) dengan perendaman 24 jam.

Penetapan konsentrasi merupakan modifikasi dari penelitian yang dilakukan oleh Ernawati tahun 2000, perlakuan tersebut adalah :

N_0 = kontrol (0 ppm)

N_1 = Perendaman EDT dengan konsentrasi 250 ppm

N_2 = Perendaman EDT dengan konsentrasi 500 ppm

N_3 = Perendaman EDT dengan konsentrasi 750 ppm

N_4 = Perendaman EDT dengan konsentrasi 1000 ppm

Adapun tata letak dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

N_2U_1	N_1U_2	N_0U_1	N_2U_2	N_4U_2
N_0U_2	N_3U_1	N_1U_3	N_0U_3	N_2U_3
N_3U_2	N_1U_1	N_4U_1	N_3U_3	N_4U_3

Keterangan :

$N_0 - N_4$ = Perlakuan

$U_{1,2,3}$ = Ulangan

4.4. Prosedur Penelitian

4.4.1. Persiapan Media Tanam

Tanah kebun Biologi yang diambil sampai kedalaman 20 cm dikeringanginkan kemudian diayak. Hal yang sama dilakukan pada pupuk kandang. Setelah itu tanah dicampur dengan pupuk kandang dengan perbandingan 3:1, lalu dimasukkan kedalam polybag.

4.4.2. Isolasi Nikotin

Sampel dari daun Tembakau dibersihkan dan dikeringanginkan \pm 2 minggu. Daun Tembakau yang telah kering dihaluskan dengan mortar, kemudian di masukkan ke dalam gelas piala dengan menambahkan 100 ml larutan NaOH lalu aduk \pm 15 menit. Campuran di saring dengan saringan vakum, dipindahkan kembali campuran ke dalam gelas piala semula dan ditambahkan 30 ml aquadest. Campuran dikocok dan kemudian disaring kembali untuk memisahkan partikel-partikel kecil dengan glass wool. Filtrat diekstrak dengan menambahkan 25 ml eter dan dikocok dengan hati-hati selama 5 menit. Campuran dibiarkan memisah menjadi dua lapisan. Lapisan berair ditambah lagi dengan 25 ml eter segar dan diekstrak kembali. Lapisan organik disatukan dengan ekstrak pertama. Dilakukan ekstraksi ketiga kalinya dengan jumlah eter yang sama, dan lapisan organik disatukan semuanya. Lapisan berair dibuang. Pelarut dipisahkan dari ekstrak dengan rotary evaporator, kemudian dipindahkan kedalam labu Erlenmeyer 50 ml. Eter diuapkan pada suhu kamar, residu berupa cairan seperti minyak adalah nikotin dan ditentukan titik didihnya. Ekstrak disimpan dalam wadah yang ditutup dengan aluminium foil (Anonimus, 2005).

4.4.3. Persiapan Bibit dan Perlakuan

Biji Bayam direndam dalam larutan ekstrak daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L) dengan konsentrasi 0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm dan 1000 ppm. Perendaman dilakukan selama 24 jam. Kemudian direndam dalam air selama 1 hari baru ditebar dalam polybag. Setiap polybag berisi 10 biji Bayam. Setelah Bayam berumur seminggu, dilakukan seleksi dengan memilih 1 tanaman untuk tinggal dalam polybag.

3.4.4. Pemeliharaan

Penyiraman dilakukan 2 kali sehari yaitu pagi dan sore hari. Jika ada gulma yang tumbuh di dalam polybag, dilakukan penyiangan.

3.4.5. Pemanenan

Panen dilakukan setelah tanaman Bayam berumur 35 hari setelah tanam dengan cara mencabut Bayam tersebut (Rukmana, 2003).

3.4.6. Pembuatan Preparat

Untuk mendapatkan anatomi sel dibuat preparat menggunakan metoda rajang dan squash. Caranya dapat dilakukan sebagai berikut : Ujung akar diambil dan dibersihkan, kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi asam asetat glasial 40% selama 15 menit pada temperatur 5⁰C. Selanjutnya dicuci dengan aquadest sampai bersih dan dimasukkan ke dalam botol yang berisi HCL 0,1 N selama 2 menit pada suhu 6⁰C. Sampel diambil dan dimasukkan ke dalam botol dan diwarnai dengan acetocarmin 1% selama 1-3 jam. Sampel diambil dan diletakkan diatas kaca objek, kemudian dirajang dengan menggunakan silet dan ditutup dengan kaca penutup sambil ditekan agar preparat menyebar. Selanjutnya dilewatkan perlahan-lahan diatas pembakar Bunsen dan dibiarkan selama beberapa menit. Kalau terjadi kelebihan pewarnaan, kaca objek dibalik dengan perlahan-lahan diatas tisu agar zat warna dapat diserap (Prakas, 1986).

4.4.7. Pengukuran Bagian Sel Tanaman

Pengukuran bagian sel tanaman menggunakan mikrometer objektif dan mikrometer okuler. Sebelum pengukuran, terlebih dahulu dilakukan peneraan skala objekmikrometer dengan skala okulermikrometer. Cara peneraannya sebagai berikut:

1. Mata ditempatkan diatas lensa okuler yang telah diberi okulermikrometer, dilihat apakah skala okuler telah tampak jelas
2. Objekmikrometer diletakkan di bawah lensa objektif, dicari bayangan yang jelas dari skala-skala objekmikrometer tersebut bersama-sama dengan bayangan skala okulermikrometer
3. Kedua bayangan skala tersebut dibuat sejajar dengan memutar okuler, titik-titik 0 dari kedua skala tersebut diletakkan sama tinggi dengan menggerakkan objekmikrometer
4. Dicari bayangan garis kedua skala yang berimpit tersebut. Dihitung jumlah bagian skala pada masing-masing mikrometer, dihitung dari titik 0 sampai garis skala yang berimpit tadi (Creedy.1978)

Contoh :

5 skala objekmikrometer = 40 skala okulermikrometer

5 skala objekmikrometer = 50 μ

50 μ = 40 skala okulermikrometer

1 μ = 0.8 skala okulermikrometer

1 skala okulermikrometer = 1.25 μ

4.5. Parameter Pengamatan

4.5.1. Parameter Utama

a. Ukuran Sel (μm)

Ukuran sel meliputi panjang dan lebar sel yang diperoleh dengan mengamati preparat di bawah mikroskop dengan pembesaran 40X. Pengukuran dibantu dengan mikrometer objektif dan okuler.

b. Diameter inti Sel (μm)

Diameter inti diukur dibawah mikroskop dengan pembesaran 40X. Pengukuran dibantu dengan mikrometer objektif dan okuler.

4.5.2. Parameter Pendukung

a. Tinggi tanaman (cm)

Tinggi tanaman diukur dari pangkal batang sampai ujung daun yang tertinggi dengan cara meluruskan semua daun tanaman keatas menggunakan mistar.

b. Diameter batang (mm)

Diameter batang diukur dengan menggunakan jangka sorong pada bagian yang paling besar.

c. Ukuran Daun (cm)

Ukuran daun meliputi panjang dan lebar daun. Panjang daun diukur dari pangkal helaian daun sampai keujung daun terpanjang. Sedangkan Lebar daun diukur dari daun yang terlebar pada tanaman dengan menggunakan mistar.

4.6. Analisa Data

Semua data yang telah diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis varians (ANAVA). Dan untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan dilakukan Uji lanjut DMRT dengan taraf 5% (Sudjana, 1991).