



INDEKS MITOSIS PUCUK DAUN *Hibiscus rosa-sinensis* L. VARIASI SINGLE PINK PADA BEBERAPA VARIASI WAKTU

MITOTIC INDEX OF THE LARGE SINGLE PINK *Hibiscus rosa-sinensis* LEAF SHOOT AT DIFFERENT SAMPLING TIMES

Nur Annisa Iriani, Astari Dwiranti, dan Andi Salamah*

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Kampus UI, Depok,
16424, Indonesia

*Corresponding author: salamah@sci.ui.ac.id

Naskah Diterima: 15 Oktober 2018; Direvisi: 18 Februari 2019; Disetujui: 09 April 2019

Abstrak

Hibiscus rosa-sinensis L. atau kembang sepatu merupakan tanaman hias yang memiliki banyak manfaat dan merepresentasikan sifat poliploidi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui Indeks Mitosis (IM) dan jumlah kromosom pucuk daun *H. rosa-sinensis* pada beberapa variasi waktu. Indeks Mitosis dan waktu pengambilan pucuk sangat diperlukan untuk studi kromosom karena pada tahap tersebut karakter-karakter kromosom dapat diamati dengan jelas dan mudah dihitung. Waktu pengambilan pucuk yang dilakukan yaitu pada 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 WIB. Pembuatan sediaan kromosom dilakukan menggunakan metode *squash* menggunakan pewarna Aceto-orcein. Tahapan perlakuan meliputi perendaman pucuk daun di dalam air dingin selama 3 jam, fiksasi dalam larutan Carnoy selama ± 24 jam, dan hidrolisis dalam larutan HCl 5N selama 30 menit. Hasil penelitian menunjukkan nilai IM tertinggi meristem pucuk daun *H. rosa-sinensis* variasi *single pink* besar muncul pada pukul 10:00 sebesar 94%. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa waktu sampling yang optimal untuk analisis kromosom *H. rosa-sinensis* L. variasi *single pink* besar adalah pukul 10:00 dengan jumlah kromosom $2n = \text{ca. } 69-111$. Hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk studi kromosom selanjutnya serta acuan untuk sampling variasi lainnya.

Kata kunci: Indeks mitosis; Kromosom; Mitosis; Waktu pengambilan sampel

Abstract

Hibiscus rosa-sinensis L. is an ornamental plant that has many benefits and represents the character of polyploidy. The purpose of this study is to find out the Mitotic Index of leaf shoots *Hibiscus rosa-sinensis* on several shoots sampling times. The Mitotic Index and the timing of shoots sampling time are essential for chromosome studies because at this stage, chromosomes characters can be clearly observed and easily calculated. Period time of collection the leaf shoots is from 08:00 AM to 4:00 PM, with two hours interval each at 08:00, 10:00, 12:00 AM, 2:00, and 4:00 PM. The chromosome preparation was carried out by using the squash method and aceto-orcein staining. The treatment steps included soaking the leaf shoots in cold water for 3 hours, fixation in Carnoy solution for ± 24 hours, and hydrolysis in 5N HCl solution for 30 minutes. The results showed that chromosomes were clearly visualized during the phase with the highest Mitotic Index. In addition, the percentage of Mitotic Index was found to be in line with the percentage of cells in late prophase. Among several sampling time variations, the highest Mitotic Index of *Hibiscus rosa-sinensis* leaf shoots appeared at 10:00 at 94% with the chromosome numbers of $2n = \text{ca. } 69-111$. According to the data obtained, it is concluded that 10 AM is the most optimum sampling time that can be used as the necessary information for further chromosome studies.

Keywords: Chromosome; Mitotic; Mitotic index; Sampling time

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v13i1.9454>

PENDAHULUAN

Hibiscus rosa-sinensis L. atau dikenal dengan nama lokal kembang sepatu merupakan tanaman hias yang cukup banyak diminati oleh masyarakat Indonesia dan banyak dibudidayakan di daerah tropis dan subtropis. Keindahan mahkota yang dimiliki *H. rosa-sinensis* menjadikan bunga *H. rosa-sinensis* digunakan sebagai tanaman hias, tanaman pagar, dan bunga potong. *Hibiscus rosa-sinensis* juga dimanfaatkan sebagai tanaman obat dan sumber pangan. *Hibiscus rosa-sinensis* berpotensi sebagai tanaman obat karena memiliki senyawa antikanker (Sharma, Khan, & Sultana, 2004), aktivitas antioksidan, dan antidiabetes (Sankaran & Vadivel, 2011).

Bunga *H. rosa-sinensis* bervariasi dari mulai bentuk, ukuran, dan warna. Variasi bentuk bunga *H. rosa-sinensis* yaitu *single*, *double*, *crested* (Beers & Howie, 1990). Ukuran bunga *H. rosa-sinensis* bervariasi dari kecil sampai besar dengan warna bunga yang terdiri dari merah, putih, *peach*, kuning, oranye, atau kombinasi dari warna tersebut. Variasi *H. rosa-sinensis* ditemukan di lingkungan kampus Universitas Indonesia Depok, salah satunya yaitu variasi *single pink* besar.

Keragaman dari *H. rosa-sinensis* juga dapat dilihat dari jumlah kromosomnya (Singh & Khoshoo, 1970; Song & Zhuang, 2005). Sejauh ini, perhitungan kromosom *H. rosa-sinensis* sudah banyak dilakukan namun belum ada kesepakatan mengenai jumlah kromosom *H. rosa-sinensis* tersebut. Salah satu faktor yang penting untuk mendapatkan karakter kromosom yang jelas, menyebar, mudah dihitung, dan menghindari data yang bias yaitu waktu pengambilan sampel. Pembuatan sediaan kromosom untuk mempelajari kromosom dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode. Salah satu metode yang umum digunakan adalah metode pencet atau *squash* (Jong, 1997; Abidin, 2014). Metode *squash* adalah metode yang digunakan untuk mendapatkan suatu sediaan dengan cara memencet suatu potongan jaringan sehingga kromosom dapat menyebar dan dapat diamati di bawah mikroskop (Abidin, 2014). Tahapan dalam metode *squash* yaitu pemilihan sampel, perendaman bahan dengan larutan perlakuan awal, fiksasi, hidrolisis, pewarnaan

dan pembuatan preparat dengan cara memencet (*squash*) (Abidin, 2014).

Salah satu parameter yang dapat digunakan dalam menganalisis kromosom dapat dilihat dari Indeks Mitosis (IM). Kromosom dapat terlihat ketika sedang mengalami mitosis atau pembelahan sel. Tahapan pembelahan sel memiliki waktu yang berbeda-beda tergantung jenis sel yang membelah. Waktu optimum mitosis berkaitan dengan waktu pengambilan sampel, sehingga untuk mengetahui waktu optimum pembelahan sel yang tepat diperlukan pengamatan yang berulang-ulang pada waktu pengambilan sampel yang berbeda (Abidin, 2014).

Waktu optimum pembelahan mitosis pada beberapa tumbuhan umumnya terjadi ketika fotosintesis berada pada level tertinggi menghasilkan banyak energi yang akan digunakan untuk pembelahan sel (Willie & Aikpokpodion, 2015). Mitosis membutuhkan energi yang besar sehingga mitosis terjadi pada saat energi dapat diserap secara optimal (Adesoye & Nnadi, 2011). Ekanem & Osuji (2006) menyebutkan bahwa persentase metafase yang tinggi pada siang hari terkait dengan tingkat fotosintesis yang tinggi karena ketersediaan cahaya matahari yang maksimal sehingga dapat melakukan sintesis metabolit dan energi dalam bentuk ATP. Produksi ATP sangat penting untuk pembelahan sel karena dibutuhkan untuk mensintesis berbagai enzim dan menyediakan energi yang dibutuhkan untuk pembelahan sel (Klug, Cummings, & Spencer, 2006).

Menurut Anggarwulan, Etikawati, & Setyawan (1999), waktu optimum pembelahan mitosis *Allium* sp. pada pagi hari sekitar jam 08.00-13.00 WIB dikarenakan pada pagi hari sel-selnya berada pada kondisi aktif. Penelitian Abidin (2014) menunjukkan aktivitas mitosis yang paling aktif pada genus *Allium* bervariasi, *A. sativum* dan *A. fistulosum* terjadi pada pagi hari yaitu pada jam 09.00 WIB dan 06.00 WIB sedangkan *A. cepa* pada siang hari jam 12.00 WIB. Penelitian (Willie & Aikpokpodion, 2015) menunjukkan periode aktivitas pembelahan mitosis *Vigna unguiculata* paling aktif pada pukul 07.00-14.00 dan puncaknya pada pukul 11.00-13.00. Penelitian Osuji & Sweet (2010) menunjukkan periode waktu pembelahan mitosis yang paling aktif pada

akar *Treculia africana* yaitu antara pukul 14.00-18.00, dan presentase tertinggi pada pukul 16:00.

Setiap jenis tumbuhan memiliki waktu pembelahan sel yang berbeda-beda dan setiap tumbuhan memiliki jam biologis yang mengatur waktu optimum pembelahan mitosis (Muhlisyah, Muthiadin, Wahidah, & Aziz, 2014; Willie & Aikpokpodion, 2015). Banyaknya sel yang membelah dapat dipengaruhi oleh faktor waktu pengambilan sampel (Etikawati & Setyawan, 2000). Penentuan IM dan waktu pengambilan sampel sangat diperlukan karena pada tahap ini karakter-karakter kromosom dapat diamati dengan jelas dan mudah dihitung sehingga dapat dilakukan studi kromosom. Dalam penelitian ini, IM *H. rosa-sinensis* variasi *single pink* besar dihitung dari pucuk daun yang disampling pada waktu yang berbeda.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Perkembangan Tumbuhan dan Laboratorium BioImaging, Departemen Biologi, FMIPA UI, Depok pada bulan Januari-Mei 2018. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah pucuk daun *H. rosa-sinensis* variasi *single pink*. Pengambilan sampel pucuk daun dilakukan pada pukul 08:00, 10:00, 12:00, 14:00 dan 16:00 WIB.

Pembuatan Sediaan Kromosom

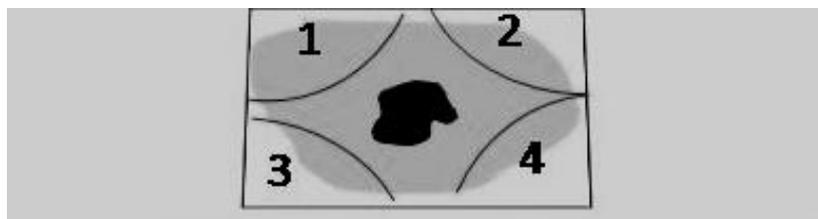
Pembuatan sediaan kromosom pada penelitian ini menggunakan metode *squash*. Pucuk daun direndam di dalam larutan perlakuan awal aquades selama 3 jam pada suhu ± 5 °C (lemari es). Pucuk daun kemudian direndam dalam larutan fiksatif Carnoy pada suhu ± 5 °C selama ± 24 jam dan dibilas dengan akuades sebanyak tiga kali. Setelah dibilas, pucuk daun selanjutnya direndam dalam larutan hidrolisis HCl 5 N selama 30 menit pada suhu ± 25 °C, direndam dengan aceto-

orcein 2% selama ± 24 jam, serta disimpan di lemari es pada suhu ± 5 °C (Singh, 2002).

Setelah proses pewarnaan selesai, pucuk daun diletakkan di atas kaca objek lalu dibilas dengan larutan asam asetat 45% menggunakan pipet tetes. Tahap tersebut diulang sebanyak dua kali, kemudian sampel ditutup dengan kaca penutup. Tahapan terakhir adalah *squashing* dengan cara menekan kaca penutup menggunakan tissue dan tangan. Kaca penutup diketuk-ketuk menggunakan ujung pensil agar sel-sel pucuk daun menyebar. Sediaan kromosom diberi label penamaan dan ditempatkan dalam wadah tertutup yang sebelumnya telah dibungkus dengan kertas tissue dan disemprot alkohol 70% agar sediaan kromosom tetap lembab serta tidak kering.

Pengamatan Sediaan Kromosom

Pengamatan sediaan kromosom dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x40 untuk menghitung persentase masing-masing fase dari pembelahan sel yaitu interfase dan mitosis (profase awal, profase akhir, metafase, anafase, dan telofase). Persentase interfase dan fase mitosis untuk setiap waktu pengambilan pucuk dihitung dengan membagi jumlah sel yang berada pada fase tertentu (interfase, profase awal, profase akhir, metafase, anafase, dan telofase) dengan total sel yang diamati pada sampel tersebut. Pengamatan dilakukan dalam 4 titik bidang pada preparat kemudian difoto menggunakan software LAZ. Skema pengamatan sediaan kromosom dapat dilihat pada Gambar 1. Jumlah minimum sel yang diamati adalah 80–300 sel per foto (Rachma, 2017). Perhitungan kromosom dilakukan dari lima sel pada masing-masing waktu pengambilan pucuk, sehingga total sel yang digunakan dalam perhitungan jumlah kromosom yaitu 25 sel.



Gambar 1. Skema pengamatan sediaan kromosom. 1–4= bidang pengamatan

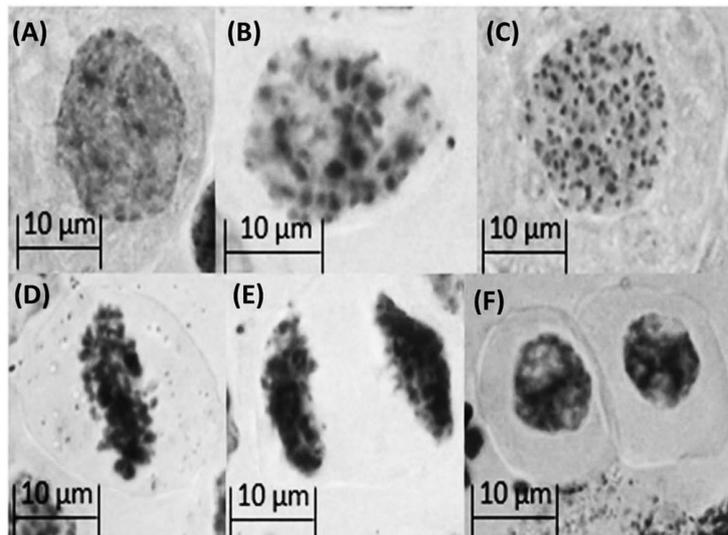
Pengolahan dan Analisis Data

Pengambilan data dilakukan dengan metode observasi dengan cara menghitung jumlah sel dalam tiap fase-fase mitosis pada setiap preparat yang telah difoto untuk kemudian dilakukan perhitungan dengan rumus: Indeks Mitosis= (Jumlah sel mitosis/jumlah seluruh sel) x 100%.

HASIL

Fase sel yang diamati pada penelitian yaitu interfase, profase awal, profase akhir, metafase, anaphase, dan telofase. Perbedaan karakteristik setiap fase tersebut dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan hasil pengamatan, interfase ditandai dengan inti sel yang terwarnai dengan jelas, sitoplasma terlihat seperti kabut, dan belum ditemukan kromosom (Gambar 2.A). Profase awal ditandai dengan

kromosom mulai terbentuk dari benang-benang kromatin sehingga posisinya masih bertumpukan seperti pada Gambar 2.B. sedangkan profase akhir ditandai dengan kromatin yang memendek dan menebal sehingga membentuk kromosom seperti pada Gambar 2.C. Metafase ditandai dengan terlihatnya kromosom yang menebal dan kromosom berjajar pada bidang ekuator (Gambar 2.D). Anafase ditandai dengan kromosom yang mulai tertarik ke arah kutub-kutub yang berlawanan seperti pada Gambar 2.E. Telofase ditandai dengan sel membelah menjadi dua sel identik atau disebut dengan peristiwa sitokinesis yang ditandai dengan terbentuknya dinding pemisah di tengah-tengah sel seperti pada Gambar 2.F.



Gambar 2. Fase pembelahan sel pucuk daun *Hibiscus rosa-sinensis* variasi *single pink* besar. Perbesaran 100x10. (A) interfase, (B) profase awal, (C) profase akhir, (D) metafase, (E) anafase, dan (F) telofase

Data yang diperoleh dari pengamatan dan perhitungan persentase interfase dan fase-fase mitosis pada sel dengan waktu pengambilan pucuk yang berbeda-beda ditunjukkan pada Gambar 3. Hasil pengamatan menunjukkan persentase masing-masing fase pembelahan sel dari tiap waktu pengambilan pucuk. Berdasarkan hasil penelitian, pada setiap waktu pengambilan pucuk terdapat sel yang sedang mengalami mitosis. Persentase tingkat pembelahan sel bervariasi dari waktu pengambilan pucuk pukul 08:00 hingga pukul 16:00. Persentase interfase yang tertinggi terlihat pada pukul 08:00 sebesar 29,9%,

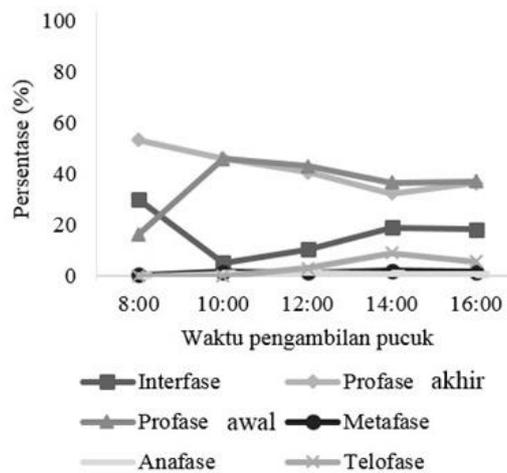
kemudian menurun pada pukul 10:00 (5,3%). Setelah pukul 10:00, persentase interfase kembali meningkat pada pukul 12:00 (10,5%) dan 14:00 (19,1%). Pada pukul 16:00, persentase interfase masih relatif tinggi (18,3%).

Berbeda dengan interfase dimana benang-benang kromatin tidak menebal, pada mitosis benang-benang kromatin berkondensasi membentuk kromosom sehingga analisis kromosom dapat dilakukan. Oleh karena itu, tingginya indeks mitosis dijadikan salah satu parameter yang harus dicapai untuk melakukan analisis kromosom.

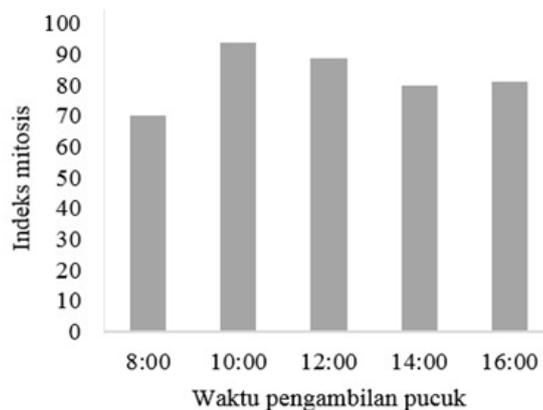
Indeks Mitosis pada pucuk daun *H. rosa-sinensis* variasi *single pink* besar dalam beberapa variasi waktu sampling dalam penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 4.

Hasil perhitungan jumlah kromosom *H. rosa-sinensis* dilakukan pada setiap waktu

pengambilan pucuk yaitu pada pukul 08:00; 10:00; 12:00; 14:00; dan 16:00 ditampilkan pada Tabel 1. Jumlah kromosom yang diperoleh dari setiap waktu pengambilan pucuk bervariasi berkisar antara $2n = \text{ca. } 69-111$.



Gambar 3. Persentase interfase dan fase-fase mitosis pada sel dengan waktu pengambilan pucuk yang berbeda



Gambar 4. Persentase indeks mitosis pucuk daun *H. rosa-sinensis* variasi *single pink* besar

Tabel 1. Jumlah kromosom *H. rosa-sinensis* variasi *single pink* besar

No.	Waktu Pengambilan Pucuk	Jumlah kromosom
1.	08:00	$2n = \text{ca. } 81, 86, 91, 92, 102$
2.	10:00	$2n = \text{ca. } 96, 104, 104, 105, 111$
3.	12:00	$2n = \text{ca. } 69, 74, 79, 79, 106$
4.	14:00	$2n = \text{ca. } 74, 74, 86, 87, 103$
5.	16:00	$2n = \text{ca. } 74, 76, 79, 84, 85$

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh, karakter-karakter yang ditunjukkan oleh setiap fase (Gambar 2) sesuai dengan yang dikemukakan oleh Campbell, Reece, dan Mitchell (2008). Seperti tampak pada Gambar 2, tahapan pembelahan sel yang memudahkan penghitungan kromosom karena strukturnya

yang paling pendek, tebal, dan menyebar adalah tahap profase akhir. Oleh karena itu, tingginya jumlah sel yang berada pada profase akhir merupakan indikator yang baik untuk melakukan analisis kromosom.

Persentase tiap fase siklus sel (Gambar 3) menunjukkan kecenderungan interfase terjadi dalam waktu yang relatif lama. Hal tersebut

sesuai dengan literatur yang menjelaskan bahwa interfase merupakan tahap yang memakan waktu paling banyak dalam satu siklus sel, yaitu 90% dari siklus sel dengan durasi 20-23 jam (Batygina, 2002). Lamanya waktu yang dihabiskan dalam interfase bervariasi dan berbeda pada tiap jenis sel dan organisme (Cooper, 2000; Batygina, 2002).

Fase mitosis (profase, metafase, anafase, dan telofase) memiliki durasi sekitar 10% dari satu siklus sel (Batygina, 2002). Profase awal secara keseluruhan memiliki persentase tertinggi pada semua waktu pengambilan pucuk. Persentase tertinggi untuk profase awal yaitu sebesar 53,4% ditemukan pada waktu pengambilan pucuk pukul 10:00. Peningkatan persentase profase akhir terjadi pada pukul 08:00 (16,3%) sampai 10:00 (46%), kemudian tetap stabil dan relatif tinggi pada pukul 12:00 (43%), 14:00 (36,6%), dan 16:00 (37,2%). Persentase profase awal dan profase akhir yang diperoleh dari pengamatan pada *H. rosa-sinensis* variasi *single pink* besar tidak berbeda jauh. Profase memakan waktu paling lama dibanding dengan tahap yang lain dalam fase mitosis yaitu setengah proses dari satu fase mitosis (Cooper, 2000).

Persentase metafase dan anafase memiliki nilai lebih rendah dibandingkan dengan interfase, profase awal, dan profase akhir. Persentase tertinggi metafase hanya sebesar 2,1% ditemukan pada pukul 14:00. Sedangkan anafase secara keseluruhan memiliki persentase terendah pada semua waktu pengambilan pucuk. Persentase anafase tertinggi hanya sebesar 1,3% ditemukan pada pukul 12:00. Anafase merupakan tahap tersingkat dibanding tahap yang lain dalam satu fase mitosis (Campbell, Reece, & Mitchell 2008). Persentase telofase tidak ditemukan pada pukul 08:00 dan 10:00, namun ditemukan pada pukul 12:00 (3%), 14:00 (9%), dan 16:00 (5,7%). Persentase tertinggi telofase yaitu sebesar 9% ditemukan pada pukul 14:00.

Nilai Indeks Mitosis (IM) tertinggi meristem pucuk daun *H. rosa-sinensis* variasi *single pink* besar muncul pada pukul 10:00, yaitu sebesar 94%. Selain itu, hasil yang diperoleh juga menunjukkan persentase profase akhir memiliki persentase yang tinggi daripada fase yang lain. Kromosom dapat terlihat jelas ketika berada pada fase tersebut.

Indeks Mitosis meningkat saat jumlah sel dalam interfase menurun dan profase akhir meningkat, hal tersebut sesuai dengan penelitian Osuji dan Sweet (2010); Adesoye dan Nnadi (2011) yang mengatakan bahwa IM tertinggi ditunjukkan oleh persentase profase akhir sel yang tinggi. Pada waktu pengambilan pucuk pukul 10:00 didapatkan persentase profase akhir yang tinggi dengan nilai interfase yang rendah.

Berdasarkan *Index to Plant Chromosome Numbers* (IPCN) dan hasil penelitian yang didapat, jumlah kromosom *H. rosa-sinensis* belum menunjukkan keseragaman. Jumlah kromosom yang ditemukan dalam penelitian ini memiliki beberapa persamaan dengan jumlah kromosom dari beberapa penelitian yang terdata dalam IPCN. Jumlah kromosom yang sama tersebut adalah 84 pada penelitian Singh dan Khoshoo (1970); Juanjuan dan Donghong (2001); Song dan Zhuang (2005). Genus *Hibiscus* memiliki jumlah kromosom dasar yaitu $x=7, 8, 9, 11, 12, 15, 17, 19, 20$ dan 39 (Singh & Khoshoo, 1970) dan *H. rosa-sinensis* memiliki jumlah kromosom dasar yaitu $x=9$ (Singh & Khoshoo, 1970). Variasi jumlah kromosom yang didapatkan beragam pada tanaman satu variasi yaitu *H. rosa-sinensis* variasi *single pink* besar. Hasil yang diperoleh dapat mengindikasikan bahwa jumlah *H. rosa-sinensis* bersifat mixoploid, yaitu variasi kariologi pada dua atau lebih jumlah kromosom yang berbeda ditemukan pada sel yang berbeda pada satu tumbuhan (Stace, 1980).

Berdasarkan data yang diperoleh, penelitian ini memberikan informasi waktu yang dapat dijadikan acuan pemotongan pucuk daun untuk studi kromosom yang memiliki IM tertinggi adalah pukul 10:00.

SIMPULAN

Indeks Mitosis (IM) *Hibiscus rosa-sinensis* pada setiap waktu pengambilan pucuk berbeda-beda, IM tertinggi terjadi pada waktu pengambilan pucuk pukul 10:00 dengan nilai 94%. Hasil tersebut dapat dijadikan acuan studi kromosom lebih lanjut. Jumlah kromosom *Hibiscus rosa-sinensis* variasi *single pink* besar yang diperoleh dari setiap waktu pengambilan pucuk bervariasi berkisar antara $2n = \text{ca. } 69-111$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) UI atas HIBAH PITTA 2017 atas nama Dr. Andi Salamah (Nomor: 619/UN2.R3.1/HKP.05.00/2017) yang telah mendanai penelitian ini.

REFERENSI

- Abidin, A. A. (2014). Studi indeks mitosis bawang untuk pembuatan media pembelajaran preparat mitosis. *BioEdu*, 3(3), 571-579.
- Adesoye, A. I. & N. C. Nnadi. (2011) Mitotic Chromosomes Studies of Some Accessions of African Yam Bean, *Sphenostylis sternocarpa* (Hochst. ex. A. Rich.) Harm. African Journal of Plant Science 5: 835-841
- Anderson, N. O. (2007). *Flower Breeding and Genetics*. California: Springer.
- Anggarwulan, E., Etikawati, N., & Setyawan, A. D. (1999). Karyotipe kromosom pada tanaman bawang budidaya (Genus *Allium*; Familia Amaryllidaceae). *BioSMART*, 1(2), 13-19.
- Batygina, T. B. (2002). *Embryology of flowering plants: Terminology and concepts, Vol. 1: Generative organs of flower*. Enfield: Science Publishers, Inc.
- Beers, L., & Howie, J. (1990). *Growing Hibiscus*. G. T. Hong Kong: Setters Pty Limited.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., & Mitchell, L. G. (2008). *Biology*, 8th Edition. San Francisco: Pearson Education, Inc.
- Cooper, G. M. (2000). *The cell: a molecular approach*, 2nd Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Ekanem, A. M. & J. O. Osuji. (2006). Mitotic Index Studies on Edible Cocoyams (*Xanthosoma* and *Colocasia* spp.). African Journal of Biotechnology 5: 846-849.
- Etikawati, N., & Setyawan, A. D. (2000). Studi sitotaksonomi genus *Zingiber*. *Biodiversitas*, 1(1), 8-13.
- Fukui, K., & Iijima, K. (1991). Somatic chromosome map of rice by imaging methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(5), 589-596.
- Fukui, K., & Nakayama, S. (1996). *Plant chromosome: laboratory methods*. USA: CRC Press.
- Jong, K. (1997). *Laboratory manual of plant cytological techniques*. Edinburg: Royal Botanic Garden.
- Juanjuan, S., & Donghong, Z. (2001). Chromosome numbers and ploidy of several plants in *Hibiscus* L. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 9(3), 213-216.
- Klug, W. S., M. R. Cummings, & C.A. Spencer. (2006). *Concepts of Genetics* 8th edition. Pearson Education International. 676 p.
- Muhlisyah, M., Muthiadin, C., Wahidah, B. F., & Aziz, I. R. (2014). Preparasi kromosom fase mitosis markisa ungu (*Passiflora edulis*) varietas edulis Sulawesi Selatan. *Biogenesis*, 2(1), 48-55.
- Osuji, J. O., & Sweet, O. (2010). Mitotic index studies on *Treculia africana* Decne in Nigeria. *Australian Journal of Agricultural Engineering*, 1(1), 25-28.
- Rachma, I. (2017). *Pengaruh Pretreatment Air Dingin, Paradichlorobenzene (PDB), Hydroxyquinoline (OQ), serta PDB:OQ (1:1) Kromosom Hibiscus rosa-sinensis L. (Skripsi)*. Dept. Biologi FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
- Sankaran M., & Vadivel, A. (2011). Antioxidant and antidiabetic effect of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower extract on streptozotocin induced experimental rats-a dose response study. *Notulae Scientia Biologicae*, 3(4), 13-21.
- Sharma S., N. Khan, & S. Sultana. (2004). Study on prevention of two-stage skin carcinogenesis by *Hibiscus rosa-sinensis* L. extract and the role of its chemical constituent, gentisic acid, in the inhibition of tumour promotion response and oxidative stress in mice. *European Journal of Cancer Prevention* 13 (1): 53-63.
- Singh, F., & Khoshoo, T. N. (1970). Chromosomal polymorphism within the *Hibiscus rosa-sinensis* complex. *Caryologia*, 23(1), 19-27.
- Singh, R. J. (2002). *Plant Cytogenetics, second edition*. New York: CRC Press.

Song, J. J. & D. H. Zhuang. (2005). The characters of pollen grains and stomatal apparatus in *Hibiscus* L. in relation to the ploidy. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 13 (1): 49-52.

Stace, C.A. (1980). *Plant taxonomy and biosystematics*. London: Edward Arnold.

Willie, P. O. & P. O. Aikpokpodion. (2015). Mitotic activity in Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) land race "Olaudi" walp) in Nigeria. *American Journal of Plant Sciences* 6: 1201-1205.