

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi F-MIPA Universitas Diponegoro pada bulan Juli – Agustus 2004.

3.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian berupa autoklaf, neraca analitik, mikroskop, “magnetic stirer”, “orbital shaker”, oven, jarum ose, gelas benda, gelas penutup, lampu spiritus, “laminar air flow” (LAF), Erlenmeyer, termometer, universal pH indikator, skalpel, pipet, pinset, kertas saring, kapas, aluminium foil.

Bahan yang diperlukan untuk penelitian berupa tubuh buah jamur *Ling zhi* (*G. lucidum*) yang diperoleh dari tempat budidaya jamur Media Agromerapi Kaliurang, berumur 1 bulan dari munculnya primordia tubuh buah, sukrosa, larutan clorox, alkohol 70 %, NAA (naphtalene acetic acids), tauge, akuades, kloramphenikol, laktofenol.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Pembuatan Larutan Stok NAA

Serbuk NAA ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam 100 mL

akuades. Larutan dipanaskan di atas penangas air pada suhu 80°C, sambil diaduk untuk mempercepat kelarutan. Diperoleh larutan stok NAA dengan konsentrasi 1000 ppm. Untuk membuat medium dengan konsentrasi 2,5 ppm diambil 2,5 mL larutan stok dan diencerkan dengan medium hingga volume 1000 mL. Untuk membuat medium dengan konsentrasi 5; 7,5; dan 10 ppm berturut-turut diambil 5; 7,5; dan 10 mL larutan stok, kemudian diencerkan dengan medium hingga volume 1000 mL.

3.3.2. Pembuatan Medium “TEB” dan Medium Produksi

Tauge sebanyak 100 gram direbus selama 2 jam dalam 1000 mL akuades, disaring dan ditambah sukrosa 60 gram kemudian ditambah akuades hingga volume 1000 mL lalu diaduk menggunakan “magnetic stirer”. Medium TEB yang telah dibuat, sebelum disterilisasi ditambah dengan kloramphenikol 0,1 gram (Gams *et al.*, 1987) dan NAA dari larutan stok NAA yang telah dibuat, dengan volume 2,5 mL, 5 mL, 7,5 mL, dan 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi NAA dalam medium sebesar 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm dan 10 ppm. Medium tanpa penambahan NAA merupakan medium dengan konsentrasi NAA 0 ppm. Medium diaduk diatas “magnetic stirer” untuk melarutkan bahan yang ditambahkan, dilakukan pengaturan pH medium hingga 6 dengan menambahkan larutan HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N. Medium dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL masing-masing 50 mL sebanyak 30 Erlenmeyer, dan kemudian Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan, 2 atm selama 15 menit.

3.3.3. Penyiapan dan Inkubasi Eksplan Jamur *Ganoderma lucidum*

Tubuh buah jamur *G. lucidum* berumur 1 bulan setelah munculnya primordia dipotong pada bagian tudung (pilleus) dekat tangkai dengan menggunakan skalpel steril, dipotong berbentuk kubus, ditimbang dengan neraca analitis sehingga diperoleh berat eksplan 0,25 gram. Eksplan jamur dilewatkan diatas api selama 1 menit, dimasukkan ke dalam alkohol 70% selama 3 menit dan selanjutnya eksplan dicuci berturut-turut dalam larutan clorox 10% selama 5 menit, larutan clorox 5% selama 3 menit, dan larutan clorox 1% selama 3 menit. Eksplan dicuci dengan larutan antiseptik (1000mL akuades steril ditambah 3 tetes antiseptik Betadine) selama 3 menit, selanjutnya dibilas dengan akuades steril. Eksplan kembali dilalukan di atas api dan dimasukkan ke dalam medium produksi, kemudian diinkubasikan selama 12 hari pada "orbital shaker" dengan kecepatan agitasi 90 rpm.

3.3.4. Berat Kering Miselium

Pengukuran berat kering miselium dilakukan setiap 2 hari sekali selama 12 hari inkubasi. Miselium disaring dengan menggunakan kertas saring Micherry-Negels (porositas 0,02 mm diameter 11 cm) yang telah diketahui berat keringnya, lalu ditiriskan selama 20 menit, dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 2 hari, ditimbang sampai beratnya konstan. Berat kering miselium diperoleh dari selisih berat kering miselium dalam kertas saring dikurangi berat kering kertas saring.

3.3.5. Pengamatan Struktur Hifa

Hifa jamur diambil dengan menggunakan jarum ose steril dan diletakkan pada gelas benda yang telah ditetesi 3 tetes laktofenol, ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x.

3.4. Parameter-parameter yang Diukur dan Diamati

Parameter utama adalah berat kering miselium, sedangkan parameter pendukung adalah suhu ruang inkubasi, pH medium awal dan akhir inkubasi, dan struktur mikroskopis hifa.

3.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial dengan dua faktor yaitu NAA dengan 5 konsentrasi sebagai berikut: 0 ppm (d_0), 2,5 ppm (d_1), 5 ppm (d_2), 7,5 ppm (d_3), 10 ppm (d_4) dan waktu inkubasi 0 hari (h_0), 2 hari (h_1), 4 hari (h_2), 6 hari (h_3), 8 hari (h_4), 10 hari (h_5), dan 12 hari (h_6). Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali.

Berat kering miselium yang diperoleh, dianalisis dengan uji sidik ragam (Anova) pada taraf uji 5% dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf uji yang sama (Hanafiah, 1993; Gomez & Gomez, 1995).

Matriks kombinasi perlakuan adalah sebagai berikut:

Konsentrasi NAA (ppm)	INKUBASI (Hari)						
	0	2	4	6	8	10	12
0	d ₀ h ₀	d ₀ h ₁	d ₀ h ₂	d ₀ h ₃	d ₀ h ₄	d ₀ h ₅	d ₀ h ₆
2,5	d ₁ h ₀	d ₁ h ₁	d ₁ h ₂	d ₁ h ₃	d ₁ h ₄	d ₁ h ₅	d ₁ h ₆
5	d ₂ h ₀	d ₂ h ₁	d ₂ h ₂	d ₂ h ₃	d ₂ h ₄	d ₂ h ₅	d ₂ h ₆
7,5	d ₃ h ₀	d ₃ h ₁	d ₃ h ₂	d ₃ h ₃	d ₃ h ₄	d ₃ h ₅	d ₃ h ₆
10	d ₄ h ₀	d ₄ h ₁	d ₄ h ₂	d ₄ h ₃	d ₄ h ₄	d ₄ h ₅	d ₄ h ₆

Keterangan:

d₀h₀: NAA 0 ppm pada inkubasi 0 hari

d₁h₀: NAA 2,5 ppm pada inkubasi 0 hari

d₂h₀: NAA 5 ppm pada inkubasi 0 hari

d₃h₀: NAA 7,5 ppm pada inkubasi 0 hari

d₄h₀: NAA 10 ppm pada inkubasi 0 hari

d₀h₁: NAA 0 ppm pada inkubasi 2 hari

d₁h₁: NAA 2,5 ppm pada inkubasi 2 hari

d₂h₁: NAA 5 ppm pada inkubasi 2 hari

d₃h₁: NAA 7,5 ppm pada inkubasi 2 hari

d₄h₁: NAA 10 ppm pada inkubasi 2 hari

d₀h₂: NAA 0 ppm pada inkubasi 4 hari

d₁h₂: NAA 2,5 ppm pada inkubasi 4 hari

d₂h₂: NAA 5 ppm pada inkubasi 4 hari

d₃h₂: NAA 7,5 ppm pada inkubasi 4 hari

d₄h₂: NAA 10 ppm pada inkubasi 4 hari

d₀h₃: NAA 0 ppm pada inkubasi 6 hari

d₁h₃: NAA 2,5 ppm pada inkubasi 6 hari

d₂h₃: NAA 5 ppm pada inkubasi 6 hari

d₃h₃: NAA 7,5 ppm pada inkubasi 6 hari

d₄h₃: NAA 10 ppm pada inkubasi 6 hari

d₀ : NAA 0 ppm

d₁ : NAA 2,5 ppm

d₂ : NAA 5 ppm

d₃ : NAA 7,5 ppm

d₄ : NAA 10 ppm

d₀h₄: NAA 0 ppm pada inkubasi 8 hari

d₁h₄: NAA 2,5 ppm pada inkubasi 8 hari

d₂h₄: NAA 5 ppm pada inkubasi 8 hari

d₃h₄: NAA 7,5 ppm pada inkubasi 8 hari

d₄h₄: NAA 10 ppm pada inkubasi 8 hari

d₀h₅: NAA 0 ppm pada inkubasi 10 hari

d₁h₅: NAA 2,5 ppm pada inkubasi 10 hari

d₂h₅: NAA 5 ppm pada inkubasi 10 hari

d₃h₅: NAA 7,5 ppm pada inkubasi 10 hari

d₄h₅: NAA 10 ppm pada inkubasi 10 hari

d₀h₆: NAA 0 ppm pada inkubasi 12 hari

d₁h₆: NAA 2,5 ppm pada inkubasi 12 hari

d₂h₆: NAA 5 ppm pada inkubasi 12 hari

d₃h₆: NAA 7,5 ppm pada inkubasi 12 hari

d₄h₆: NAA 10 ppm pada inkubasi 12 hari

h₁ : inkubasi 2 hari

h₂ : inkubasi 4 hari

h₃ : inkubasi 6 hari

h₄ : inkubasi 8 hari

h₅ : inkubasi 10 hari

h₆ : inkubasi 12 hari