

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat Dan Waktu

Tempat : Laboratorium Mikro-Bio-Genetika Jurusan Biologi FMIPA
Universitas Diponegoro

Waktu : April sampai Juni 2000.

B. Alat Dan Bahan

Alat : mikroskop, gelas benda, ose, lampu bunsen, erlenmeyer 100 ml, tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur 1ml, gelas ukur 500 ml, haemocytometer, 'Laminar air flow', autoklaf, oven, inkubator, 'hot plate stirrer', timbangan, ayakan mekanik 30 mash, plastik mika milimeter blok, parutan, pisau, blender, kertas tissue, kapas.

Bahan : Isolat kapang *Metarrhizium anisopliae* dari Laboratorium Lapangan Dinas Perkebunan Jateng, Potato Dekstrosa Agar, biji jagung pecah giling dari pasar, singkong dari pasar, air bersih, aquadest, garam fisiologis, alkohol.

C. Cara Kerja

1. Persiapan Inokulum Kapang *Metarrhizium anisopliae*.

- Dilarutkan medium PDA sebanyak 3,9 gr dalam aquadest 100 ml dengan menggunakan erlemeyer, dipanaskan diatas 'hot plate stirer' sampai mendidih.

- Media PDA dalam erlemeyer disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, tekanan 2 atm kemudian dituangkan kedalam beberapa tabung reaksi.
- Diinokulasikan isolat kapang *Metarrhizium anisopliae* kedalam tabung reaksi.
- Diinkubasikan pada suhu kamar selama 15 hari.

2. Pemeliharaan Inokulum Kapang

- Setelah diinkubasi selama 15 hari pada suhu kamar, didapatkan kultur murni pada media miring PDA sebagai kultur cadangan, kemudian disubkultur pada beberapa agar miring PDA untuk kultur kerja.
- Kultur cadangan disimpan pada suhu 4°C sedangkan kultur kerja diinkubasi terlebih dahulu pada suhu kamar selama 15 hari sebelum digunakan.

3. Persiapan Media Singkong dan Media Jagung.

a. Media Singkong

- Singkong 1kg dikupas kulitnya dicuci dengan air bersih, kemudian diparut.
- Hasil parutan diperas kemudian dikeringkan. Air perasan didiamkan hingga terjadi endapan pati. Hasil parutan kering dan endapan pati dicampur kemudian dihaluskan dengan blender.
- Hasil singkong yang diblender diayak dengan ayakan mekanik ukuran 30 “mash” agar didapatkan tepung singkong dengan ukuran sama.

b. Media Jagung

- Biji jagung pecah giling kering 1 kg dibersihkan dengan air bersih kemudian dikeringkan.
- Biji jagung pecah giling kering yang bersih dihaluskan dengan blender, kemudian diayak dengan ayakan mekanik berukuran 30 “mash”.

4. Pembuatan Media Singkong dan Media Jagung

- Tepung singkong ditimbang 500 gr, dicampur dengan aquadest sebanyak 500 ml dalam gelas ukur kemudian diaduk secara merata.
- Campuran tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam 16 ulangan cawan petri, masing-masing sebanyak 30 gr. Hal yang sama juga dilakukan terhadap tepung jagung.
- Media jagung dan media singkong disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.
- Didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar.

5. Inokulasi Kapang Pada Media Singkong dan Media Jagung

- Kultur kerja dalam media PDA ditambah dengan garam fisiologis 0,9 %^(b/v) sebanyak 10 ml dan dikorek-korek secara hati-hati dengan ose bulat sehingga didapatkan suspensi konidia dengan kerapatan $4,5 \times 10^5$ / ml. Suspensi ini digunakan sebagai inokulum.

- Inokulum dengan kerapatan konidia $4,5 \times 10^5$ / ml sebanyak 0,1 ml diinokulasikan ke dalam 30 gram media singkong dengan 16 kali ulangan. Hal yang sama dilakukan terhadap media jagung.
- Setelah diinokulasi, diinkubasi selama 15 hari pada suhu kamar.

6. Pengamatan Luas Penutupan Kapang dan Pengukuran pH medium

- Luas penutupan kapang diamati setiap hari, luas penutupan dihitung dengan menggunakan milimeter blok pada masa inkubasi 15 hari dari kedua media.
- Pengukuran pH media dilakukan pada hari ke-15. Caranya dengan menimbang 1 gr media singkong yang kemudian ditumbuk sampai berbentuk tepung. Tepung yang sudah jadi dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml.
- Tepung di dalam erlenmeyer 100 ml ditambahkan aquadest 20 ml kemudian dikocok dengan 'stirrer' sampai homogen, kemudian didiamkan selama 5 menit dan dibiarkan endapan mengendap. Setelah terjadi suspensi diukur pH singkong, demikian juga dengan jagung dilakukan perlakuan yang sama. (Apriyanto dan Fardiaz, 1989).

7. Penghitungan Kerapatan Konidia

Kerapatan konidia dihitung dengan cara sebagai berikut :

- Diambil 10 gr media jagung maupun media singkong yang telah ditumbuhi kapang, dilarutkan dengan garam fisiologis 0,9 % ($\frac{b}{v}$) sebanyak 90 ml dalam gelas ukur 500 ml kemudian diaduk selama kurang lebih 5 menit.

- Suspensi diambil dengan pipet dan dengan hati-hati diisikan ke ruang hitung (Haemocytometer).

- Cara penghitungan konidia dilakukan sebagai berikut :

Satu kotak kecil mempunyai sisi 0,05 mm, kedalaman kotak kecil 0,1mm. Jika penghitungan dilakukan pada 80 kotak, maka volume 80 kotak kecil = $80 \times 0,00025 = 0.02 \text{ mm}^3$. Faktor koreksi yaitu volume : volume sel yang dihitung (80 kotak).

Volume yang diinginkan = 1 mm^3 .

Maka untuk penyetaraannya = $1 : 0,02 = 50$

Bila jumlah konidia pada 80 kotak kecil = E

Jumlah konidia = $E \times 50 / \text{mm}^3$

Jika $1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3$. Maka dalam satuan ml didapatkan rumus sbb:

$E \times 50 \times 1000 / \text{ml}$.

Dalam satuan gram didapatkan rumus sbb:

$$\frac{E \times 50 \times 1000 \times 90}{10} / \text{g}$$

D. Parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- Kerapatan konidia kapang dalam satuan per g
- Luas penutupan kapang dalam satuan cm^2 .

E. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan satu faktor yaitu perlakuan media (jagung, singkong), masing-masing perlakuan diulang 16 kali. Sebagai variabel bebas adalah media dan sebagai variabel tergantung yaitu kerapatan konidia, dan luas penutupan kapang. Data yang didapat diuji dengan uji T pada taraf kepercayaan 1 %.

