

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat Penelitian

Pengambilan sampel serasah hutan mangrove dilakukan di hutan mangrove Desa Kemujan, Karimunjawa. Untuk tahap isolasi, identifikasi serta uji kemampuan selulolitik isolat kapang dilakukan di Laboratorium Mikro-Bio-Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang.

B. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 1999 sampai dengan bulan Oktober 2000.

C. Alat dan Bahan

Alat : mikroskop, cawan petri, labu erlenmeyer, pipet ukur, spatel driglasky, gelas benda, gelas penutup, ose runcing, jarum preparat, pipet, bunsen, tabung reaksi, timbangan, “grab”, termos es, pH meter, autoklaf, oven, LAF (“Laminar Air Flow”), “beaker glass”, gelas ukur, “slide micrometer”, jangka sorong, refraktosalinometer, termometer tanah.

Bahan : medium Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC Agar), medium Czapek Dox Agar (E.Merck): 45,4 gr untuk 1 liter medium, medium Potato Dextrose Agar (E.Merck) : 39 gr untuk 1 liter medium,

medium Malt Ekstrak Agar (MEA), alkohol, chloramphenicol 50 ppm, laktofenol, aquadest.

D. Cara Kerja

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada 3 stasiun yang ditentukan secara purposif dengan masing-masing 3 sub lokasi dari serasah hutan mangrove, pada setiap sub lokasi dilakukan 3 ulangan pengambilan dengan menggunakan “grab” untuk serasah yang terdapat pada substrat berlumpur atau pengambilan secara langsung dengan centong untuk serasah yang terdapat pada substrat yang padat, sampel diambil pada bagian atas (5-7 cm) kemudian dikompositkan. Sampel yang didapat segera dimasukkan ke dalam kantong plastik, diikat dan dimasukkan ke dalam termos es. Sampel yang didapat kemudian dibawa ke laboratorium untuk segera ditanam pada medium penapisan (CMC Agar) untuk tahap isolasi.

2. Isolasi Kapang

2.1. Teknik agar sebar

Diambil 10 gr serasah mangrove dimasukkan dalam labu erlenmeyer berukuran 500 ml, kemudian ditambahkan aquadest sampai volume 100 ml dan digojog. Kemudian diinokulasikan sebanyak 0,1 ml suspensi pada permukaan medium CMC Agar (Gams *et al.*, 1987) yang telah diberi chloramphenicol 50 ppm (Booth, 1971) dan diratakan secara aseptik pada seluruh permukaan medium dengan menggunakan spatel driglasky. Diinkubasikan pada suhu kamar sampai tampak pertumbuhan koloni-koloni kapang pada permukaan medium. Dilakukan

pengamatan pada koloni kapang yang tumbuh. Masing-masing koloni kapang yang representatif kemudian dipindahkan ke medium umum kapang (TEA) sebagai kultur murni. Selanjutnya dalam tahap identifikasi kapang dipindahkan ke medium yang spesifik untuk masing-masing kapang (Penn, 1991).

2.2 Teknik agar tuang

Diambil sedikit serasah mangrove (0,005-0,015g) dan diletakkan pada cawan petri, kemudian medium CMC Agar (Gams *et al.*, 1987) yang telah diberi chloramfenicol 50 ppm (Booth, 1971) dituangkan ke dalam cawan petri lalu digoyang-goyang supaya substrat dan agar tercampur dengan baik. Diinkubasi pada suhu kamar sampai tampak koloni-koloni kapang yang tumbuh pada permukaan medium. Dilakukan pengamatan pada koloni kapang yang tumbuh. Masing-masing koloni kapang yang representatif kemudian dipindahkan ke medium umum kapang (TEA) sebagai kultur murni. Masing-masing kapang kemudian dipindah ke medium yang spesifik untuk tahap identifikasi (Hendrarto, 1983).

3. Pengamatan Morfologi Koloni Kapang

Kapang diinokulasi pada medium spesifik untuk masing-masing kapang, seperti medium CDA, PDA dan MEA. Koloni kapang yang tumbuh kemudian diamati ciri morfologinya yang tampak pada permukaan koloni dan sebalik koloni.

4. Pengamatan Morfologi Mikroskopis Kapang

Gelas benda dibersihkan dari kotoran dengan menggunakan alkohol, kemudian ditetesi dengan laktofenol. Biakan kapang lalu diambil sedikit dengan menggunakan ose runcing dan diletakkan di atas gelas benda, kemudian miselium kapang diuraikan dengan menggunakan jarum preparat dan ditutup dengan gelas penutup. Diusahakan agar tidak terbentuk gelembung udara pada preparat yang akan diamati. Preparat selanjutnya di amati dengan menggunakan mikroskop yang dimulai dengan perbesaran kecil, kemudian ditingkatkan ke perbesaran yang lebih kuat (Hadioetomo, 1990).

5. Identifikasi Kapang

Identifikasi kapang dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni, morfologi mikroskopis dan selanjutnya diidentifikasi dengan mencocokkan ciri-ciri yang ada dengan buku-buku identifikasi menurut Ellis (1971), Barnett and Hunter (1976), Raper and Fennell (1977), Pitt (1979), Domsch, Gams and Anderson (1980), serta Samson and Hoekstra (1995).

6. Uji Kemampuan Selulolitik Isolat Kapang

Isolat kapang diinokulasikan pada satu tempat yaitu pada bagian tengah medium CMC Agar sebanyak 1 ose. Masing-masing isolat diinkubasi pada suhu kamar sesuai dengan waktu optimalnya. Kemudian hasilnya diamati dengan mengukur diameter zona hidrolisis yang terbentuk di sekitar koloni setelah permukaan medium digenangi dengan larutan gram Jodium (Basuki, 1988), selain itu diukur pula diameter koloni kapang dengan menggunakan jangka sorong.

Rasio antara diameter daerah hidrolisis dan diameter koloni kapang dapat dipakai untuk mengetahui tingkat kemampuan selulolitik kapang (Putro, 1980).

7. Pengamatan Indikator Lingkungan

Selain pengambilan sampel serasah mangrove, juga dilakukan pengukuran indikator lingkungan pada tempat sampling yaitu :

- pH, dengan menggunakan pH meter
- temperatur, dengan menggunakan termometer tanah
- salinitas, dengan menggunakan refraktosalinometer

E. Parameter

Dalam penelitian ini parameter yang diamati adalah jenis isolat kapang, dan diameter koloni kapang serta diameter zona hidrolisis yang terbentuk pada medium CMC Agar.

F. Analisis Data

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif.