

## BAB IV

### METODA PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengkulturan jamur *A. auricula* secara kultur “submerged” dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang pada bulan Agustus 2000–Maret 2001.

Uji viabilitas miselium jamur *A. auricula* yang berasal dari kultur “submerged” dilaksanakan di Unit Usaha Jamur “Berkah Cendawan” Ungaran, Semarang.

#### B. Alat dan Bahan

##### 1. Alat.

Autoklaf, timbangan analitik / sartorius, erlenmeyer 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, botol kultur, gelas ukur 10 ml, 100 ml, gerus porselein, pinset, magnetic stirer, kompor listrik, bunsen, bekkor glass 1000 ml, selang, gelas benda dan gelas penutup, mikroskop, skalpel, petridish, pipet ukur, ose, aerator, batang pengaduk, laminar air flow, oven.

##### 2. Bahan.

###### *a. Media Taoge Extract Broth (TEB) dimodifikasi / liter*

- Taoge 100 g
- Glukosa 0,1 g

- Ekstrak yeast 0,2 g
- Aquadest 1000 ml
- CMC (carboxy metil cellulose) 0,05 % ; 0,1 % ; 0,3 % ; 0,5 % (b/v), sebagai sumber karbon yaitu selulosa

***b. Sterilan***

- Kaporit 100 ppm
- Alkohol 70 %, 96 %
- Bayclean
- Betadine

***c. Bahan pewarnaan miselium jamur***

- Lactofenol
- Metyline blue
- Aseton
- Kutek

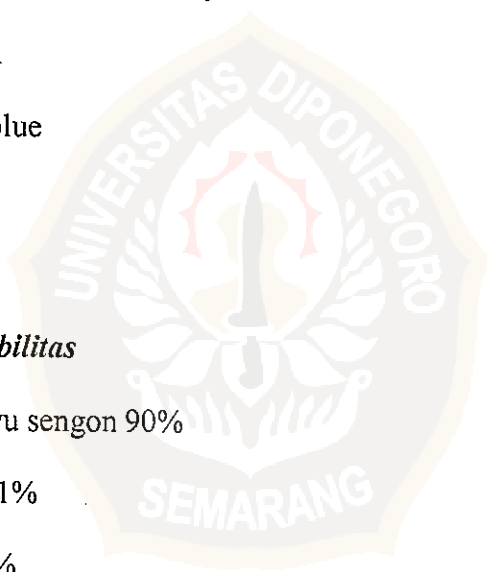
***d. Media uji viabilitas***

- Serbuk kayu sengon 90%
- Kapur 0,5-1%
- Gips 0,1-1%
- Air secukupnya

**C. Cara Kerja**

**1. Media Taoge Extract Broth (TEB) dimodifikasi / liter.**

- Taoge 100 g direbus selama 2 jam dalam 1000 ml aquadest.



- Air rebusan taoge disaring dan ditambahkan aquadest sampai volume mencapai 1000 ml.
- Glukosa, ekstrak yeast, kloramfenikol dimasukkan ke dalam air rebusan taoge.
- Medium dimasukkan ke dalam botol kultur dengan volume masing-masing 100 ml.
- Penambahan CMC dilakukan dengan konsentrasi 0,05 %; 0,1 %; 0,3 %; 0,5 %.
- Media TEB yang telah ditambah dengan selulosa kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

## 2. Cara pembuatan media tanam untuk uji viabilitas :

- Bahan-bahan untuk uji viabilitas dipersiapkan dengan komposisi dan presentase sebagai berikut:

Serbuk kayu sengon yang halus	: 90%
Kapur (CaCO <sub>3</sub> atau CaOH)	: 0,5-1%
Gips	: 0,1-1%
Air	: secukupnya.

- Serbuk kayu dicampur dengan kapur dan gips sampai merata.
- Kadar air media tanam tersebut diatur hingga mencapai 45-60%. Pengaturan kadar air dilakukan dengan menambah air (bila perlu). Untuk mengetahui bahwa kadar air media tanam sudah cukup, caranya yaitu dengan mengepalkan media tanam itu. Apabila gumpalan media tanam

tidak pecah dan tidak mengeluarkan air, berarti kadar air media telah cukup.

- Keasaman media diatur hingga mencapai pH 6,8 dengan penambahan kapur apabila media terlalu asam atau dengan menggunakan gips apabila media terlalu basa.
- Media tersebut dimasukkan ke dalam botol atau wadah lainnya, seperti kantong plastik yang diberi cincin pralon, sebanyak 2/3 bagian tanpa dipadatkan. Selanjutnya wadah ditutup dengan kapas sampai rapat dan ditutup lagi dengan kertas perkamen.
- Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>o</sup> C tekanan 2 atm selama 15 menit.
- Media didinginkan selama 6-12 jam sebelum dilakukan inokulasi dengan kultur murni.

### **3. Isolasi jaringan (pembuatan eksplan).**

- Primordial jamur yang digunakan berumur 10 hari setelah pembukaan log dan berkualitas baik.
- Tangan dan meja untuk kerja didesinfeksi dengan alkohol 70%.
- Primordial jamur dilewatkan diatas api selama 1 menit.
- Primordial diambil secara hati-hati dengan pinset steril.
- Primordial jamur dibelah menjadi dua dengan menggunakan skalpel steril.
- Bagian dalam jamur yang akan digunakan sebagai eksplan dipotong dan ditimbang dengan berat 0,5 g.

- Eksplan dicuci dengan aquadest steril.
- Eksplan dimasukkan ke dalam alkohol 70 % selama 3 menit.
- Eksplan dimasukkan kedalam bayclean 10 % selama 10 menit.
- Eksplan dimasukkan kedalam bayclean 5 % selama 5 menit.
- Eksplan dimasukkan kedalam bayclean 1 % selama 1 menit.
- Eksplan dimasukkan ke dalam larutan betadine (100 ml aquadest ditambah dengan 3 tetes betadine) selama 3 menit.
- Eksplan dibilas dengan aquadest steril
- Eksplan dimasukkan dalam medium “submerged” dan diinkubasi.

(Wawancara pribadi, 1999)

#### 4. Pembuatan larutan pencucian

- Erlenmeyer yang berisi 1000 ml aquadest ditambah dengan 0,1g kaporit.
- Larutan kaporit disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup> C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### 5. Proses kultur “submerged”

- Primordial jamur dikulturkan di dalam botol kultur yang diisi dengan 100 ml media cair.
- Masing-masing botol kultur dihubungkan dengan aerator dengan kecepatan  $\pm 400$  ml /menit.
- Kultur diinkubasi selama 21 hari.
- Miselium jamur diambil selama 3 hari sekali untuk dihitung berat basah dan berat kering.

## 6. Pengamatan Struktur Hifa

- Hifa jamur diambil menggunakan ose steril dan diletakkan pada gelas benda.
- Hifa jamur pada gelas benda ditetesi dengan metylene blue, lactofenol dan aquadest (sebagai pelarut) dan ditutup dengan gelas penutup.
- Struktur hifa diamati dibawah mikroskop.

## 7. Pengukuran berat basah

- Miselium jamur dalam botol kultur disaring menggunakan kertas saring.
- Miselium dimasukkan ke dalam gerus porselein (sebelumnya ditimbang dulu kertas saring dan gerus porselein).
- Miselium ditimbang berat basahnya.

## 8. Pengukuran berat kering

- Agregat jamur dalam botol kultur dipanen dan dicuci bersih.
- Miselium disaring menggunakan kertas saring
- Miselium dikeringkan dengan oven kira-kira 40-42<sup>0</sup> C selama 24 jam.
- Miselium didinginkan dalam eksikator, kemudian ditimbang.
- Miselium dipanaskan lagi dalam oven dengan suhu yang sama selama ± 30 menit dan didinginkan dalam eksikator, kemudian ditimbang.
- Pengeringan dilakukan terus menerus sampai tercapai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut 0,2 mg).
- Biomassa per satuan waktu inkubasi dihitung sehingga dapat diketahui fase eksponensial pertumbuhan miselium jamur (pertambahan biomassa).

(Rahman, 1992)

### 9. Analisis Selulosa (metode Chesson)

- Sampel (lihat lampiran 04 hasil analisa selulosa) diambil, kemudian ditambah dengan 150 ml H<sub>2</sub>O.
- Sampel tersebut kemudian direfluk dengan suhu 100<sup>0</sup> C dalam “waterbath” selama 1 jam.
- Sampel disaring dan didapatkan supernatan yang kemudian dicuci dengan air sampai netral (volume 300 ml).
- Supernatan dikeringkan dengan oven sampai konstan hingga didapatkan berat (a).
- Supernatan kering ditambah dengan 150 ml 72% 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Supernatan tersebut kemudian direfluk dalam “waterbath”/”hot plate” selama 1,5 jam pada pendingin balik.
- Supernatan disaring dan dicuci dengan H<sub>2</sub>O sampai netral (volume 400 ml).
- Supernatan yang telah disaring kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105<sup>0</sup> C
- Supernatan yang telah dioven ditimbang dan didapatkan berat (b).
- Data yang didapat dimasukkan dalam rumus :

$$\text{Selulosa} = \frac{a-b}{a} \times 100\% = \frac{b}{a}$$

- Pengulangan dilakukan sebanyak dua kali ulangan dengan berat dan sampel yang berbeda .

(Datta, 1981)

## 10. Uji viabilitas

- Miselium jamur pada fase eksponensial yang terdapat dalam media TEB, dihaluskan/diblender kemudian diambil menggunakan pipet 10 ml.
- Miselium yang telah dihaluskan kemudian diinokulasikan ke dalam media tanam dan diinkubasi selama 2-4 minggu.
- Pertumbuhan miselium jamur diamati (sebagai data pendukung).

### D. Parameter-parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah berat kering, berat basah, kenampakan visual miselium secara mikroskopik, volume daerah pembentukan miselium (sebagai data pendukung).

### E. Unit Percobaan

*Keterangan perlakuan (S)* : konsentrasi selulosa 0% (S0), konsentrasi selulosa 0,05% (S1), konsentrasi selulosa 0,1% (S2), konsentrasi selulosa 0,3% (S3), konsentrasi selulosa 0,5% (S4).

*Keterangan kelompok (K)* : Kelompok 1 (K1), Kelompok 2 (K2), Kelompok 3 (K3), Kelompok 4 (K4), Kelompok 5 (K5).

### F. Analisis Data

Penelitian yang dilakukan menggunakan analisis data Rancangan Kelompok Lengkap Teracak faktor tunggal dengan 5 taraf , pada taraf uji 5%. Apabila terjadi perbedaan nyata antar perlakuan dan antar kelompok maka dilanjutkan



dengan uji Duncan pada taraf uji 5%. Apabila tidak terjadi perbedaan nyata antar perlakuan dan antar kelompok maka tidak dilakukan uji Duncan.

