

BAB IV

METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat

- Waktu : Oktober 2000 – Februari 2001
- Tempat : Laboratorium Mikro-Bio-Genetika Jurusan Biologi Undip.
: Unit usaha jamur “Berkah Cendawan” Ungaran

B. Alat dan Bahan

- Alat** : Autoklaf, aerator, skalpel, timbangan analitik, erlenmeyer 250 ml dan 1000 ml, petridish, gelas ukur, mikroskop, thermometer, higrometer, ose, Laminair Air Flow (LAF), batang pengaduk, pipa udara steril, bunsen, plastik, gelas benda, gelas penutup, pipet steril, penggaris, botol
- Bahan** : Eksplan jamur tiram putih, alkohol 70 dan 40%, kaporit, betadine, sukrosa, kapur, ekstrak yeast, gips, aquades, serbuk gergaji, kloramfenikol, metilen biru, bekatul, laktofenol, kertas saring, kapas.

C. Cara Kerja

1. Persiapan

a. Pencucian Alat

Alat-Alat dan gelas dicuci dengan menggunakan detergen, alat-alat dan gelas tersebut kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih

b. Sterilisasi Alat dan akuadest.

Alat-alat dari gelas dan alat logam (pinset, kalpel) disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 160 – 180 °C selama 2 jam. Pipa saluran udara yang dibungkus dengan kertas dan akuades yang telah dimasukkan ke dalam botol disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2. Pembuatan Media TEB (Taoge Ekstrak Broth) Termodifikasi

- Kecambah (taoge) sebanyak 100 gram (untuk 1 liter media) direbus selama ± 2 jam, disaring dan filtratnya diambil.
- Hasil saringan ditambah dengan ekstrak yeast 0,2 gram dan kloramfenikol 0,1 gram.
- Kemudian dilakukan penambahan sukrosa dengan berbagai konsentrasi yaitu 0 % b/v; 1 % b/v; 3 % b/v; 5 % b/v; 7 % b/v ; 9 % b/v
- Masing-masing konsentrasi ditempatkan pada masing-masing erlemeyer 1000 ml dan diberi label menurut konsentrasinya.
- Selanjutnya dilakukan penambahan aquades sedikit demi sedikit hingga volumenya mencapai 1000 ml.
- Bahan diaduk diatas magnetik stirer untuk melarutkan bahan tersebut.
- Diatur pH larutan hingga 6,8 – 7.
- Larutan dimasukkan ke dalam botol dan tiap-tiap botol diisi sebanyak 100 ml atau 10 buah botol untuk setiap 1000 ml larutan yang dibuat.

- Botol yang telah berisi media ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil.
- Media kemudian disterilisasikan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3. Pembuatan Larutan Pencucian

- Kaporit sebanyak 0,1 gram dilarutkan ke dalam aquades 1000 ml dan selanjutnya ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilisasikan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

4. Isolasi Eksplan Jamur Tiram Putih

- Dipilih primordial jamur yang berumur 3 hari setelah plastik media jamur dibuka.
- Peralatan untuk isolasi dan tangan didesinfeksi dengan alkohol 70 %.
- Primordial dilewatkan diatas api selama 1 menit.
- Bagian yang kotor dan terkontaminasi oleh mikroba segera dibuang dan kemudian dicuci dengan akuades steril.
- Tubuh buah yang dijadikan eksplan dibelah menjadi 2 bagian dengan skalpel steril dan bagian dalamnya diambil.
- Kemudian bagian tersebut dipotong menjadi bagian-bagian yang kecil dan dan ditimbang kira-kira 0,5 g.

- Eksplan dicuci dengan akuades steril.
- Eksplan kemudian dicuci dengan menggunakan alkohol 70 %
- Selanjutnya berturut –turut dicuci dengan larutan kaporit 10 % selama 10 menit, larutan kaporit 5% selama 5 menit dan larutan kaporit 1 % selama 1 menit.
- Kemudian eksplan dicuci dengan larutan betadine (3 tetes betadine dalam 100 ml akuades steril) selama \pm 2 menit.
- Dibilas dengan akuades steril
- Eksplan diinokulasikan ke dalam media TEB, masing- masing media 1 eksplan.
- Bagian tutup (bagian atas) botol dibuat aliran udara dengan cara memasukkan pipa steril ke dalam media tersebut.
- Setelah diinokulasi dengan eksplan, media ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil.

5. Proses Kultur Submerged.

- Media yang telah diinokulasi dengan eksplan jamur tersebut kemudian ditempatkan pada ruangan yang bersuhu 28 C
- Bagian atas dari media cair dihubungkan dengan suatu aliran udara melalui pipa-pipa udara yang berhubungan dengan suatu aerator.
- Setiap 3 hari sekali dilakukan pengamatan terhadap miselium jamur yang ditumbuhkan selama 21 hari pengamatan.

6. Penentuan Berat Basah dan Berat Kering.

- Setiap 3 hari sekali, masing-masing media yang mengandung miselium tersebut kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring.
- Dilakukan penimbangan berat basah miselium jamur terlebih dahulu hingga beratnya konstan.
- Miselium dikeringkan dengan oven pada suhu 40 °C selama 2 hari.
- Dilakukan penimbangan terhadap berat kering miselium jamur hingga diperoleh berat kering yang konstan.
- Hasil berat basah dan berat kering miselium dicatat.

(Rombach,1988).

7. Pembuatan Kurva Pertumbuhan.

- Data yang diperoleh dari pengukuran berat kering miselium jamur tiram per satuan waktu, selanjutnya dibuat suatu kurva pertumbuhan dengan sumbu horisontal (sumbu X) adalah waktu (hari pengamatan), sedangkan sumbu vertikal (sumbu Y) adalah berat basah dan berat kering miselium.

8. Pengamatan Selular Miselium Jamur.

- Gelas benda dibersihkan dengan alkohol, kemudian ditetesi dengan larutan laktofenol.
- Diambil sedikit jamur dari hasil kultur “submerged” dengan jarum preparat dan kemudian diletakkan di atas gelas benda yang telah diberi larutan laktofenol.

- Kemudian ditetesi kembali dengan larutan metilen biru dan ditutup dengan gelas penutup.
- Preparat diamati dibawah mikroskop untuk mengamati struktur seluler miselium jamur tersebut.

9. Uji Viabilitas Miselium Jamur (Uji Pendukung).

- Bahan media untuk uji viabilitas disediakan diantaranya serbuk gergaji, 90 %, bekatul 5%, kapur 5%, gips 0,1% dan air.
- Bahan dimasukkan ke dalam kantung plastik atau botol dan disterilkan pada suhu 120 °C tekanan 2 atm selama 15 menit.
- Bahan kemudian didiamkan selama 1 hari agar terjadi pengomposan.
- Media yang telah disterilkan didiamkan selama 24 jam.
- Biakan murni dari kultur “submerged” pada fase eksponensial dihaluskan (diblender).
- Biakan diinokulasikan ke dalam media tersebut dengan menggunakan pipet steril sebanyak 10 ml.
- Kemudian media diinkubasi pada suhu 24-26 °C.
- Diamati daerah pembentukan miselium pada permukaan media tanam setiap 1 minggu sekali hingga miselium memenuhi semua medium pertumbuhan (“Full Grown Compost”).

10. Rancangan Penelitian dan Analisis Data.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Kelompok Lengkap Teracak (RKLK) faktor tunggal yaitu konsentrasi sukrosa yang berbeda yaitu 0% b/v; 1 % b/v; 3 % b/v; 5 % b/v; 7 % b/v; 9 % b/v. Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali.

Untuk setiap hasil pengamatan, data dianalisis dengan menggunakan Anova pada taraf uji 5% dan apa bila terdapat perbedaan rerata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf uji yang sama (Gomez & Gomez, 1995). Parameter yang diamati meliputi : berat basah miselium, berat kering miselium. Sebagai parameter lingkungan diukur suhu dan kelembaban lingkungan selama penelitian berlangsung.

