

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi Universitas Diponegoro dan di rumah jamur “Berkah Cendawan” Ungaran pada bulan September 2000 sampai Maret 2001.

B. Alat dan Bahan

Alat :

- | | |
|----------------------------|---------------------|
| 1. Autoklaf | 13. Ohaus |
| 2. Laminair Air Flow (LAF) | 14. Batang pengaduk |
| 3. Shaker horisontal | 15. Oven |
| 4. Erlenmeyer | 16. Botol kultur |
| 5. Pipet ukur | 17. Hot plate |
| 6. Skalpel | 18. Magnetic stirer |
| 7. Pinset | 19. Desikator |
| 8. Bunsen | 20. Blender |
| 9. Cawan petri | 21. pH meter |
| 10. Jarum ose | 22. Higrometer |
| 11. Gelas ukur 100 ml | 23. Termometer |
| 12. Sartorius | |

Bahan :

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1. Tubuh buah jamur umur
40 hari setelah inokulasi | 7. Chloramphenicol |
| 2. Alkohol 70% dan 96% | 8. Desinfektan (Merk "Sunclin") |
| 3. Kapas | 9. Akuades |
| 4. Taoge | 10. Aluminium foil |
| 5. Ekstrak Yeast | 11. Kertas saring |
| 6. Sukrosa | 12. Log jamur |

C. Cara Kerja**Pembuatan Medium Taoge Ekstrak Cair Modifikasi :**

1. Bahan-bahan untuk pembuatan medium disiapkan, yaitu taoge sebanyak 100 gram, sukrosa 60 gram, ekstrak yeast 0,5 gram dan chloramphenicol sebanyak 0,1 gram.
2. Taoge direbus selama 2 jam dengan akuades kemudian disaring dan diambil filtratnya.
3. Bahan-bahan tersebut dilarutkan ke dalam akuades sampai mencapai volume 1000 ml.
4. Bahan dipanaskan di atas penangas dan diaduk dengan magnetic stirer sampai larut.
5. pH medium diukur dengan pH meter sampai diperoleh angka yang stabil.
6. Medium dimasukkan ke dalam botol kultur, masing-masing sebanyak 100 ml.
7. Botol ditutup rapat dengan kapas dan aluminium foil.

8. Medium tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit.

Isolasi Jaringan Tubuh Buah Jamur :

1. Laminair Air Flow (LAF) dihidupkan 15 menit sebelum digunakan untuk inokulasi.
2. LAF dibersihkan dan disterilkan dengan alkohol 70%.
3. Alat-alat dalam LAF disterilkan dengan alkohol 70%.
4. Bakal induk (eksplan) disiapkan dengan cara aseptis.
5. Primordial tubuh buah jamur dicuci dengan akuades.
6. Eksplan diambil dengan cara memotong bagian dalam jamur, yaitu pada pertemuan antara tangkai dan tudung dengan berat 0,5 gram.
7. Eksplan dicuci dengan alkohol 96% selama 10 menit.
8. Setelah itu eksplan disterilisasi menggunakan desinfektan dengan konsentrasi 10%, 5% dan 1%, masing-masing selama 10, 5 dan 1 menit.
9. Eksplan dimasukkan dalam campuran akuades steril dan chloramphenicol 100 ppm selama 10 menit.
10. Eksplan dicuci dengan akuades steril selama 10 menit.

Metode Kultur "Submerged"

1. Eksplan yang telah dicuci dilalukan di atas api bunsen kemudian diinokulasikan dalam botol kultur yang telah disiapkan.
2. Botol kultur yang telah berisi inokulum diagitasi selama 21 hari pada shaker horisontal, masing-masing dengan kecepatan 0, 50, 100 dan 150 rpm.
3. Dilakukan pengamatan pertumbuhan miselium setiap 3 hari sekali.

4. Pertumbuhan miselium ditunjukkan dengan terbentuknya agregat berwarna putih kecoklatan.
5. Agregat yang terbentuk disaring dengan kertas saring, setelah itu ditimbang dengan timbangan analitik (Sartorius) sampai diperoleh berat stabil. Berat yang didapat merupakan berat basah.
6. Setelah itu agregat dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C sampai diperoleh berat kering, kemudian ditimbang dengan sartorius sampai didapatkan berat yang konstan.
7. Hasil yang diperoleh diplotkan dalam kurva pertumbuhan, dengan sumbu X sebagai hari pengamatan dan sumbu Y sebagai berat basah dan berat kering.

Pengamatan Kenampakan Miselium Secara Mikroskopik

1. Gelas benda dibersihkan dengan alkohol.
2. Diambil sedikit miselium jamur dengan jarum preparat, kemudian diletakkan di atas gelas benda setelah itu ditetesi larutan laktofenol.
3. Untuk pewarnaan, miselium ditetesi dengan larutan metilen biru, kemudian ditutup dengan gelas penutup.
4. Preparat diamati di bawah mikroskop untuk melihat kenampakan miselium jamur secara mikroskopis.

Uji Viabilitas Miselium Jamur.

1. Bahan medium untuk uji viabilitas disediakan, diantaranya serbuk gergaji sebanyak 90 %, bekatul 5%, kapur 5% dan air.
2. Bahan dimasukkan ke dalam kantong plastik dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3. Medium yang telah disterilkan didiamkan selama 24 jam.
4. Agregat dari botol kultur “submerged” disaring kemudian diblender secara aseptis dalam LAF. Agregat ini diambil dari botol kultur pada saat terjadi fase eksponensial.
5. Bibit diinokulasikan ke dalam medium dengan pipet steril sebanyak 10 ml.
6. Medium yang telah diinokulasi dengan miselium tersebut diinkubasi pada suhu 24-26°C.
7. Dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan jamur setiap 1 minggu sekali dengan mengukur panjang daerah pembentukan miselium sampai terjadi pertumbuhan penuh (“full grown”).

D. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Berat basah
2. Berat kering
3. Pencapaian fase eksponensial.

Sebagai parameter pendukung adalah :

1. Parameter lingkungan, meliputi temperatur, pH medium dan kelembaban udara.
2. Kenampakan miselium secara mikroskopis pada setiap perlakuan
3. Kemampuan tumbuh pada medium serbuk gergaji (uji viabilitas).

E. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Blok Lengkap Teracak (RBLT) faktor tunggal yaitu kecepatan agitasi, yang terdiri dari 4 taraf (0, 50, 100 dan 150) rpm, dengan blok sebagai ulangan.

Data dianalisis menggunakan Analisis Sidik Ragam pada taraf uji 5 %, bila minimal terdapat sepasang perlakuan yang memberikan rata-rata yang berbeda, maka dilakukan uji lanjut dengan uji Duncan pada taraf uji yang sama.

