

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat Dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dengan judul “Pertumbuhan Miselium Jamur Tiram Abu-abu (*Pleurotus sajor-caju*) pada Medium TEB (“Tauge Extract Broth”) yang Dimodifikasi dengan Berbagai Konsentrasi Sukrosa” telah dilaksanakan di Laboratorium Mikro-Bio-Genetika Jurusan Biologi Undip pada bulan September – Desember 2001.

B. Alat Dan Bahan

Alat : Autoklaf, aerator, oven, “Laminar air Flow” (LAF), timbangan analitik, erlenmeyer 100 ml, 250 ml dan 1000 ml, petridish, gelas ukur, mikroskop, termohigrometer, jarum ose, skalpel, pinset, batang pengaduk, selang plastik untuk saluran udara, sedotan plastik, lampu spiritus, gelas benda, gelas penutup, gelas arloji, pipet steril, botol kultur.

Bahan : Eksplan jamur tiram abu-abu, alkohol 70 % dan 96 %, kaporit, bahan antiseptik, “clorox”, sukrosa, ekstrak yeast, tauge, akuadest, kloramphenikol, laktofenol, metilen biru, kertas saring, kertas, karet dan kapas.

C. Cara Kerja

1. Persiapan

a. Pencucian alat

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

b. Sterilisasi alat

- Aluminium foil, alat-alat dari gelas dan alat logam (pinset, skalpel) dibungkus dengan kertas dan disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 160-180°C selama 2 jam.
- Selang plastik saluran udara dan sedotan yang telah dibungkus dengan kertas disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.
- Sebelum dihubungkan dengan botol kultur selang plastik saluran udara dialiri udara yang telah dilewatkan pada alkohol 96% selama 20 menit.
- LAF di desinfeksi dengan alkohol 70 %.

2. Pembuatan Medium TEB (“Tauge Extract Broth”) yang Dimodifikasi

- Tauge sebanyak 100 gram direbus selama 2 jam dalam 1000 ml akuadest.
- Air rebusan disaring dan filtratnya diambil.
- Hasil saringan ditambah dengan ekstrak yeast 0,2 gram dan kloramphenikol 0,1 gram.

- Kemudian dilakukan penambahan sukrosa dengan berbagai konsentrasi yaitu
 - S0 = 0 % b/v
 - S1 = 0,25 % b/v
 - S2 = 0,5 % b/v
 - S3 = 0,75 % b/v
 - S4 = 1 % b/v
 - S5 = 1,25 % b/v.
- Masing-masing perlakuan ditempatkan pada erlenmeyer 1000 ml dan volumenya ditepatkan 1000 ml kemudian diberi label menurut perlakuannya.
- Larutan diaduk diatas "magnetic stirer" untuk melarutkan bahan yang ditambahkan.
- Larutan diatur pH-nya hingga 6 dengan menambahkan larutan HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N.
- Larutan dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak 100 ml, dan kemudian botol ditutup dengan kapas, kertas kemudian ditali dengan menggunakan karet.
- Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3. Pembuatan larutan pencucian

- Kaporit sebanyak 100 mg dilarutkan ke dalam akuadest sebanyak 1000 ml dan selanjutnya ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

4. Pembuatan Eksplan Jamur *P. sajor-caju*

- Bahan jamur *P. sajor-caju* yang digunakan berumur 3 hari setelah “bag log” dibuka dan dipilih tubuh buah (struktur mikroskopis hifa binukleat) dengan kualitas yang baik.
- Bagian yang kotor segera dibuang dan dicuci dengan akuades steril.
- Tubuh buah diambil dengan menggunakan pinset steril secara hati-hati.
- Tubuh buah jamur dilewatkan diatas api selama 1 menit.
- Tubuh buah yang dijadikan eksplan dipotong pada bagian tudung dan batangnya, kemudian dibelah menjadi 2 bagian dengan skalpel steril, bagian dalam dari bagian pertemuan tangkai dan tudungnya diambil.
- Bagian tersebut dipotong menjadi bagian-bagian yang kecil dengan bentuk kubus dan ditimbang sebanyak 0,5 gram.
- Potongan eksplan dicuci dengan akuadest steril.
- Potongan eksplan dimasukkan kedalam alkohol 70 % selama 3 menit.
- Selanjutnya eksplan dicuci secara berturut-turut dengan clorox 10 % selama 10 menit, dilanjutkan dengan clorox 5 % selama 5 menit dan clorox 1 % selama 1 menit.
- Eksplan dimasukkan ke dalam larutan antiseptik (1000 ml akuadest ditambah 3 tetes antiseptik Betadine) selama 3 menit.
- Eksplan selanjutnya dibilas dengan akuadest steril.
- Eksplan dimasukkan ke dalam medium TEB dimodifikasi secara aseptis.
- Bagian tutup botol dibuat aliran udara dengan cara memasukkan sedotan steril ke dalam medium tersebut dan ditutup kembali dengan aluminium foil.

- Bagian atas dari botol kultur dihubungkan dengan selang plastik saluran udara yang kemudian dialiri udara steril dari aerator yang telah dilewatkan pada larutan pencucian.
- Selanjutnya kultur diinkubasi selama 24 hari dan pengamatan miselium jamur *P. sajor-caju* dilakukan setiap 4 hari sekali dengan mengambil miselium tiap botol kultur dari 6 botol kultur untuk tiap blok perlakuan.

5. Pengamatan Struktur Hifa

- Hifa jamur diambil dengan menggunakan jarum ose steril dan diletakkan pada gelas benda yang telah dibersihkan dengan alkohol.
- Hifa jamur ditetesi dengan laktofenol atau metilen biru, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan kemudian diamati dibawah mikroskop.

6. Pengukuran Berat Kering Miselium

- Setiap 4 hari sekali miselium *P. sajor-caju* dalam medium kultur disaring dengan menggunakan kertas saring dan airnya dibiarkan meresap kedalam kertas saring.
- Miselium dikeringkan dengan oven pada suhu 40 °C selama 2 hari.
- Dilakukan penimbangan terhadap berat kering miselium *P. sajor-caju* hingga diperoleh berat kering miselium yang konstan.

D. Parameter-parameter yang diamati

- Berat kering miselium yang kemudian dibuat kurva pertumbuhan per satuan waktu, dengan sumbu horisontal (sumbu X) adalah waktu dan sumbu vertikal (sumbu Y) adalah berat kering miselium.
- Suhu, kelembaban lingkungan dan struktur mikroskopis hifa *P. sajor-caju* sebagai parameter pendukung.

F. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan faktor tunggal, yaitu dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda (0% b/v; 0,25% b/v; 0,5% b/v; 0,75% b/v; 1% b/v dan 1,25% b/v). Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali pada waktu yang berbeda.

Untuk setiap hasil pengamatan, data dianalisis dengan menggunakan anova pada taraf uji 5% dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf uji yang sama (Sugandi dan Sugiarto, 1994).