

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### **A. KONSENTRASI DAN WAKTU INKUBASI *EHTYL METHANE SULFONATE* (EMS) YANG MEMBERIKAN EFEK MUTASI PADA JAMUR TIRAM COKELAT**

Perlakuan mutasi EMS pada penelitian menggunakan kisaran konsentrasi EMS yang mengacu pada penelitian Stonesifer & Baltz (1985: 1182), yaitu sebesar 8, 15, 20, 25, dan 30  $\mu\text{l/ml}$  selama 60 menit. Penentuan konsentrasi mutagen dilakukan untuk mendapatkan satu konsentrasi yang memberi pengaruh nyata. Pengaruh pemberian mutagen EMS pada jamur tiram cokelat diamati dengan melakukan perhitungan rasio kematian. Sel jamur yang tumbuh pada rasio kematian optimal diharapkan telah mengalami mutasi.

Perhitungan rasio kematian yang diperoleh pada kontrol (tanpa pemberian EMS) jamur tiram cokelat menunjukkan hasil rasio kematian 0% (seluruh koloni berhasil tumbuh pada medium regenerasi). Perlakuan EMS dengan konsentrasi EMS sebesar 20, 25, dan 30  $\mu\text{l/ml}$  selama 60 menit menyebabkan kematian seluruh koloni jamur tiram cokelat. Konsentrasi 8  $\mu\text{l/ml}$  menyebabkan rasio kematian sebesar 76,7% dan konsentrasi EMS 15  $\mu\text{l/ml}$  menyebabkan rasio kematian sebesar 99,8% (Gambar 8 dan Tabel 1). Menurut Keller *dkk.* (1983: 581), mutagen dianggap memberikan pengaruh nyata jika menghasilkan rasio kematian 98--99%. Berdasarkan hasil rasio

kematian yang diperoleh, konsentrasi EMS 15 µl/ml dianggap memberikan efek mutasi optimal pada jamur tiram cokelat. Koloni yang tumbuh pada konsentrasi dengan rasio kematian tersebut diperkirakan merupakan koloni yang benar-benar mengalami mutagenesis oleh mutagen EMS.

Penelitian Stonesifer & Baltz (1985: 1182) menunjukkan bahwa perlakuan EMS dengan konsentrasi 15 µl/ml menyebabkan rasio kematian sekitar 99% pada bakteri berfilamen *Streptomyces fradiae*. Bakteri berfilamen *Streptomyces fradiae* secara evolusi menempati posisi di antara bakteri sederhana (Eubacteria) dan Fungi dalam merespons perlakuan mutagen kimia dan radiasi (Stonesifer & Baltz 1985: 1180). Oleh karena itu, konsentrasi optimal EMS untuk jamur tiram cokelat sama dengan konsentrasi optimal *Streptomyces fradiae* pada penelitian Stonesifer & Baltz (1985).

Konsentrasi EMS 8 µl/ml dengan nilai rasio kematian jamur tiram cokelat sebesar 76,7% dianggap terlalu rendah dibandingkan rasio kematian pada konsentrasi EMS 15 µl/ml. Rasio kematian yang lebih rendah menunjukkan peningkatan jumlah sel yang bertahan hidup setelah mutasi. Koloni yang diperoleh dari konsentrasi EMS 8 µl/ml diperkirakan tidak menghasilkan perubahan signifikan pada metabolisme EPS karena pengaruh mutasi tidak optimal. Menurut Stonesifer & Baltz (1985: 1183), pemberian mutagen EMS pada konsentrasi rendah menyebabkan sedikit basa yang mengalami alkilasi, sehingga mutasi basa dapat diperbaiki secara langsung. Perbaikan basa secara langsung dilakukan oleh enzim metil guanin metil transferase (enzim MGMT) melalui proses transetilasi. Perbaikan basa

tersebut menyebabkan proses replikasi normal tidak terhambat sehingga sel dapat bertahan hidup.

Konsentrasi EMS 20, 25, dan 30  $\mu\text{l/ml}$  dianggap terlalu tinggi untuk jamur tiram coklat karena tidak ada sel yang dapat bertahan hidup.

Shanabruch *dkk.* (1983: 35) melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi mutagen menyebabkan peningkatan jumlah kematian sel. Mutagen EMS merupakan agen alkilasi yang bekerja secara langsung pada basa DNA (*direct-acting mutagen*) membentuk struktur  $\text{O}^6$ -etilguanin dan menghambat proses replikasi normal (Snustad & Simmons 2003: 350). Konsentrasi mutagen yang terlalu tinggi menyebabkan mutasi pada banyak basa, namun tidak semua basa dapat diperbaiki enzim MGMT. Enzim MGMT dikenal sebagai *suicide enzyme* dan bersifat *irreversible* karena hanya memperbaiki satu basa yang teretilasi dan kemudian dihancurkan oleh sel (Weaver & Hendrik 1997: 311). Mutasi yang tidak diperbaiki diperkirakan menghambat proses replikasi normal terhambat dan menyebabkan kematian sel (Stonesifer & Baltz 1985: 1183).

Perlakuan mutasi EMS pada konsentrasi 15  $\mu\text{l/ml}$  menghasilkan satu koloni jamur tiram coklat, sedangkan jumlah koloni jamur tiram coklat tanpa perlakuan EMS (kontrol) sebanyak 1.022 cfu/ml. Perlakuan EMS konsentrasi optimal pada inkubasi 60 menit tersebut terbukti memperkecil jumlah koloni jamur tiram coklat yang hidup. Menurut Holmes *dkk.* (1999: 1), keragaman genetik yang terjadi akibat pemberian mutagen dipengaruhi oleh konsentrasi dan waktu inkubasi mutagen. Olaiya & Sogin (1979: 1047) melaporkan

terjadinya peningkatan rasio kematian *Saccharomyces cerevisiae* sejalan dengan peningkatan waktu inkubasi mutagen EMS. Berdasarkan hal tersebut, mutagenesis EMS dengan konsentrasi optimal dilakukan kembali pada variasi waktu inkubasi sehingga mutan yang didapatkan lebih banyak.

Menurut Mehta *dkk.* (2003: 4044), perlakuan mutagen kimia dengan variasi waktu inkubasi 20, 40, dan 60 menit dapat meningkatkan kandungan karoten pada jamur *Blakeslea trispora* Thaxt. (1914). Oleh karena itu, perlakuan mutagenesis EMS pada jamur tiram dilakukan pada variasi waktu inkubasi tersebut. Perlakuan EMS dengan variasi waktu inkubasi diharapkan menghasilkan mutan dengan peningkatan produksi  $\beta$ -glukan sebagai komponen eksopolisakarida yang stabil secara genetik.

Total koloni yang dihasilkan melalui mutasi EMS pada berbagai waktu inkubasi berjumlah empat koloni. Masing-masing waktu inkubasi menghasilkan satu koloni jamur tiram cokelat. Koloni yang dihasilkan dari perlakuan mutagen dengan variasi waktu inkubasi 20, 40, dan 60 menit diidentifikasi sebagai isolat tiram cokelat mutagen kimia 1 (TCMK1), TCMK2, TCMK3, dan TCMK4 (Gambar 9).

Pemberian variasi waktu inkubasi EMS tidak berpengaruh pada jumlah koloni jamur tiram cokelat yang diperoleh melalui metode penyebaran fraksi miselium pada medium regenerasi. Rahmah (2005: 38) melaporkan bahwa pemberian variasi waktu pemajanan sinar UV pada *Pseudomonas denitrificans* Schegel BioMCC B12 F942/288 menghasilkan perbedaan jumlah sel yang bertahan hidup pada masing-masing waktu inkubasi. Hasil

serupa diperoleh Campbell & Yasbin (1984: 290) melaporkan bahwa penambahan inkubasi EMS menyebabkan penurunan jumlah sel *Neisseria gonorrhoeae* yang bertahan hidup. Perbedaan hasil diperkirakan karena respons sel terhadap pemberian mutagen berbeda pada setiap organisme. Menurut Campbell & Yasbin (1984: 288), aktivitas perbaikan DNA berupa mekanisme perbaikan *error-prone* dan fotoreaktivasi kurang baik pada bakteri *Neisseria gonorrhoeae*, sedangkan *Bacillus subtilis* menunjukkan aktivitas mekanisme perbaikan DNA yang lebih baik.

Jumlah koloni mutan jamur tiram cokelat yang sedikit diperkirakan juga dipengaruhi oleh metode transfer fraksi miselium pada medium regenerasi. Srikrai & Robbers (1983: 1166) melaporkan bahwa suspensi fraksi miselium *Claviceps purpurea* setelah perlakuan mutagen kimia N-metil-N-nitrosoguanidin (NTG) ditumbuhkan pada medium regenerasi dengan menggunakan 20 silinder kaca (diameter 1,2 cm, tinggi 2 cm). Koloni mutan *Claviceps purpurea* tersebut mampu tumbuh pada seluruh silinder kaca. Berdasarkan hasil Srikrai & Robbers, metode penyebaran koloni pada cawan petri diperkirakan kurang efektif untuk menumbuhkan fraksi miselium setelah perlakuan mutasi.

## **B. BERAT KERING MISELIUM JAMUR TIRAM COKELAT SETELAH PERLAKUAN EMS**

Isolat jamur tiram cokelat yang dihasilkan dari mutasi EMS dengan variasi waktu inkubasi ditumbuhkan pada medium PDB selama 20 hari untuk

penimbangan berat kering miselium. Hasil pendahuluan menunjukkan medium PDB dipenuhi pelet miselium jamur tiram coklat pada hari ke-20. Penimbangan dilakukan pada hari ke-3, 6, 10, 14, dan 20 hari. Pemilihan hari penimbangan tersebut mewakili fase lag, fase eksponensial, dan fase stasioner pertumbuhan jamur tiram coklat yang mengacu pada hasil penelitian El Khobar (2006: 36). Menurut Maziero *dkk.* (1999: 78), pengukuran miselium pada waktu yang mewakili fase pertumbuhan dapat menentukan kemampuan pertumbuhan miselium oleh jamur-jamur berfilamen.

Hasil rerata dari tiga ulangan pengukuran berat kering jamur tiram coklat kontrol dan isolat setelah pemberian mutagen EMS digambarkan dalam kurva (Gambar 10). Berdasarkan kurva rerata penimbangan berat kering miselium, berat kering isolat TCMK4 pada hari ke-3 menunjukkan nilai tertinggi (492%) dibandingkan isolat kontrol dan isolat jamur tiram coklat hasil mutasi EMS lain. Rerata berat kering miselium pada hari ke-3 dari isolat TCMK4 sebesar 1,37 g, sedangkan jamur tiram coklat kontrol sebesar 0,23 g, isolat TCMK1 sebesar 0,29 g, isolat TCMK2 sebesar 0,61 g, dan isolat TCMK3 sebesar 0,73 g (Tabel 2). Berat kering miselium isolat kontrol hari ke-14 pada penelitian berada pada kisaran berat kering miselium yang dilaporkan oleh penelitian Khanna & Garcha (1985: 10), yaitu sebesar 0,2 g dalam 100 ml medium PDB.

Berdasarkan perhitungan standar deviasi, rerata produksi berat kering hari ke-3, 6, 10, 14, dan 20 dari isolat tiram coklat kontrol dan isolat TCMK1 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata. Waktu inkubasi mutagen

diperkirakan mempengaruhi proses alkilasi basa pada jamur tiram cokelat. Berdasarkan hasil tersebut, disimpulkan bahwa kecepatan pertumbuhan miselium isolat TCMK1 tidak berbeda dengan isolat kontrol. Isolat TCMK1 merupakan isolat yang diperoleh dari perlakuan EMS dengan waktu inkubasi singkat (0 menit).

Rerata produksi berat kering miselium isolat TCMK2 dan TCMK3 pada hari ke-3 dan 6 menunjukkan peningkatan sekitar dua kali lipat dibandingkan berat kering kontrol, namun pertumbuhan pada hari ke-10 menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan kontrol dan isolat TCMK1. Rerata berat kering miselium dari isolat TCMK2 dan TCMK3 pada hari ke-14 dan 20 meningkat kembali, tetapi tidak secara eksponensial. Berdasarkan hasil tersebut diperkirakan perlakuan EMS dengan waktu inkubasi 0, 20, dan 40 menit tidak menyebabkan perubahan nyata terhadap kecepatan pertumbuhan jamur tiram cokelat. Menurut Shanabruch *dkk.* (1983: 39--40), konsentrasi mutagen dan waktu inkubasi mempengaruhi efek mutasi pada mikroorganisme. Waktu inkubasi yang terlalu singkat menyebabkan mutagen tidak bekerja dengan optimal.

Berdasarkan rerata hasil berat kering miselium isolat TCMK4, diperkirakan telah terjadi perubahan karakteristik pertumbuhan pada seluruh fase pertumbuhan. Berat kering miselium isolat TCMK4 pada fase lag, fase log, dan fase stasioner lebih tinggi dibandingkan kontrol menggambarkan kemampuan pertumbuhan miselium yang lebih cepat. Fase lag merupakan fase penyesuaian sel pada lingkungan pertumbuhan dengan membentuk

enzim-enzim pengurai substrat, sedangkan fase log merupakan fase perbanyakkan sel secara eksponensial (Gandjar *dkk.* 2006: 39). Perubahan yang terjadi pada fase-fase tersebut diduga karena adanya perlakuan mutasi EMS. Menurut Olaiya & Sogin (1979: 1046), peningkatan waktu inkubasi dari perlakuan mutagen menyebabkan peningkatan jumlah mutasi basa. Mukherjee & Sangupta (1983: 1414) melaporkan bahwa mutasi dengan pemajanan sinar UV pada jamur *Volvariella volvacea* (Bulliard ex Fries) Singer menyebabkan perubahan karakteristik pertumbuhan dan morfologi.

### **C. ANALISIS ISOZIM DARI ENZIM-ENZIM PERTUMBUHAN JAMUR TIRAM COKELAT**

Pewarna isozim yang digunakan pada penelitian adalah pewarna beberapa enzim pertumbuhan yang sering digunakan sebagai enzim penanda, yaitu enzim fosfatase asam (ACP), aspartat aminotransferase (AAT), dehidrogenase malat (MDH), dan peroksidase (PER). Pemilihan enzim tersebut berdasarkan penelitian Djajanegara *dkk.* (2004: 11) dan Zervakis *dkk.* (2001: 3189). Menurut Weeden & Wendel (1989: 49--50), enzim ACP, MDH, AAT, dan PER diekspresikan pada organel yang berbeda-beda. Perubahan ekspresi enzim penanda tersebut diharapkan dapat merefleksikan mutasi akibat perlakuan mutagen EMS.

Hasil pewarnaan enzim malat dehidrogenase (MDH) pada gel elektroforesis membentuk satu pita isozim dari isolat jamur tiram coklat kontrol, isolat TCMK1, TCMK2, dan TCMK3. Pewarnaan enzim MDH pada



isolat TCMK4 membentuk dua pita isozim pada pewarnaan enzim MDH (Gambar 11). Pembentukan pita yang lebih banyak dibandingkan kontrol diperkirakan terjadi karena pengaruh EMS. Hal tersebut diduga berkaitan dengan hasil penimbangan berat kering isolat TCMK4 lebih tinggi dibanding isolat kontrol. Menurut Moss (1961: 1), enzim MDH merupakan enzim yang berperan pada reaksi respirasi, sehingga pembentukan pita yang lebih banyak mengindikasikan adanya reaksi enzimatik yang lebih giat dan mempercepat pertumbuhan miselium jamur.

Jumlah pita isozim hasil pewarnaan dengan pewarna enzim aspartat aminotransferase (AAT) dari isolat jamur tiram cokelat kontrol tidak berbeda dengan jumlah pita isozim seluruh isolat hasil mutasi EMS, yaitu dua pita isozim (Gambar 12). Mutagenesis dengan EMS diperkirakan tidak berpengaruh terhadap ekspresi enzim tersebut. Menurut Sambrook & Rusell (2001: 131), mutasi oleh EMS bersifat acak sehingga terdapat alel-alel yang tidak mengalami mutasi.

Visualisasi pita setelah pewarnaan enzim fosfatase asam (ACP) membentuk satu pita pada lajur 1 (jamur tiram cokelat kontrol) (Gambar 13). Hasil tersebut sesuai dengan Octavia (2004: 35) yang melaporkan terbentuknya satu pita pada zimogram dari jamur tiram cokelat *wild-type* setelah diberi pewarna untuk enzim ACP. Hasil elektroforesis enzim dari isolat TCMK1 dan TCMK2 juga membentuk satu pita, sedangkan isolat TCMK3 dan TCMK4 membentuk dua pita isozim ACP. Visualisasi elektroporetik enzim elektroporetik isozim peroksidase (PER) juga

menghasilkan perubahan serupa. Jamur tiram cokelat kontrol membentuk satu pita isozim PER, sedangkan keempat isolat hasil mutasi dengan EMS membentuk dua pita isozim PER (Gambar 14).

Penambahan pita isozim jamur tiram cokelat setelah pemajanan sinar gamma dilaporkan oleh Octavia (2004: 35). Perbedaan visualisasi pita yang terbentuk mengindikasikan terjadi mutasi oleh EMS pada alel-alel pengkode enzim peroksidase. Menurut Weeden & Wendel (1989: 47), perubahan visualisasi elektroporetik enzim merefleksikan perubahan yang terjadi pada rantai DNA.

#### **D. PRODUKSI EPS DAN UJI KANDUNGAN $\beta$ -GLUKAN SEBAGAI KOMPONEN PENYUSUN EPS JAMUR TIRAM COKELAT**

Produksi EPS pada jamur tiram cokelat tidak dapat dibedakan melalui pertumbuhan mutan pada medium regenerasi. Oleh karena itu, fermentasi pada 4 mutan tiram cokelat dilakukan untuk mengetahui produksi EPS setelah perlakuan mutasi EMS. Fermentasi dilakukan dengan teknik fermentasi *submerged culture* dengan medium PDB (Lin & Yang 2006: 99). Menurut Carlile & Watkinson (1994: 116), produksi metabolit seperti EPS oleh mikroorganisme pada fermentasi substrat cair lebih efektif dibandingkan dengan fermentasi substrat padat. Hal tersebut disebabkan adanya pengadukan substrat cair sehingga seluruh bagian mikroorganisme mendapatkan asupan nutrisi yang merata.

Hasil fermentasi pada 4 mutan jamur tiram coklat menunjukkan peningkatan berat kering EPS pada isolat mutan TCMK2, TCMK3, dan TCMK4, sedangkan isolat TCMK1 mengalami penurunan berat kering EPS (Tabel 3). Berdasarkan penentuan standar deviasi, perubahan produksi EPS dari isolat TCMK4 menunjukkan perbedaan yang nyata, sedangkan perubahan produksi EPS pada isolat TCMK1, TCMK2, TCMK3 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (Gambar 15).

Produksi berat kering EPS isolat TCMK4 meningkat 28% dari produksi EPS jamur tiram coklat kontrol. Hasil serupa dilaporkan oleh Mehta *dkk.* (2003: 4044) yang menghasilkan mutan dengan produksi  $\beta$ -karoten yang lebih tinggi setelah pemberian mutagen kimia NTG pada kapang *Blakeslea trispora* Thaxt., (1914). Perubahan produksi EPS pada isolat TCMK4 diperkirakan terjadi karena mutasi EMS pada gen-gen kunci pengatur biosintesis EPS pada jamur tiram coklat. Namun demikian, menurut Broadbent (2003: 420), gen-gen kunci tersebut belum diketahui secara pasti.

Mutagenesis oleh EMS umumnya menyebabkan perubahan pada basa guanin (G) yang terdapat di rantai DNA sehingga terjadi kesalahan pemasangan basa (*mispairing base*) G-C menjadi A-T pada proses replikasi (Snustad & Simmons 2003: 350). Mutasi tersebut, jika tidak diperbaiki oleh enzim MGMT, dapat mengaktifkan mekanisme perbaikan *SOS error-prone* (Schendel *dkk.* 1978: 468--469). Menurut (Stonesifer & Baltz 1985: 1183), mekanisme perbaikan *SOS error-prone* merupakan perbaikan DNA yang

bersifat mutagenik karena mutasi basa diabaikan dan proses replikasi terus berjalan sehingga mutasi diturunkan ke sel anak.

Pengujian EPS untuk penentuan kadar  $\beta$ -glukan secara kuantitatif dilakukan dengan teknik *colorimetric assay* menggunakan reagen *congo red* (Eberendu *dkk.* 1994: 1). Ogawa *dkk.* (1973) (*lihat* Eberendu *dkk.* 1994: 7) melaporkan bahwa *congo red* bekerja dengan membentuk kompleks dengan gel  $\beta$ -glukan pada larutan alkali. Kompleks tersebut diharapkan terjadi pada  $\beta$ -glukan yang terdapat pada EPS jamur tiram cokelat. Adanya pembentukan kompleks tersebut menyebabkan  $\beta$ -glukan dapat terdeteksi melalui pembacaan absorbansi.

Kelebihan penggunaan reagen pewarna *congo red* adalah pengikatan reagen pada molekul  $\beta$ -glukan tidak dipengaruhi oleh ukuran berat molekul  $\beta$ -glukan tersebut. Sasaki *dkk.* (1976) (*lihat* Eberendu *dkk.* 1994: 7) menyebutkan bahwa fraksi lentinan dengan berat molekul kecil tidak menyebabkan perubahan pada panjang gelombang absorpsi cahaya maksimum *congo red* ( $\lambda = 488$  nm). Berdasarkan hal tersebut, *congo red* merupakan reagen yang dapat digunakan sebagai deteksi awal molekul  $\beta$ -glukan. Persamaan kurva standar  $\beta$ -glukan menggunakan reagen pewarna *congo red* yang diperoleh pada penelitian adalah  $y = 0,0874x - 0,0987$  dengan  $R^2 = 0,9939$  (Gambar 16).

Hasil uji kualitatif dan kuantitatif  $\beta$ -glukan pada sampel EPS dari isolat jamur tiram cokelat hasil mutasi EMS menunjukkan penurunan dibandingkan dengan kadar  $\beta$ -glukan pada EPS kontrol (Tabel 4 dan Gambar 17). Kadar

$\beta$ -glukan terendah sebesar 106.668,6 mg/l dihasilkan oleh isolat TCMK4. Nilai tersebut menunjukkan penurunan sebesar 40% dibandingkan dengan kadar  $\beta$ -glukan kontrol, yaitu 214.124,7 mg/l. Mutan TCMK4 diperoleh dari mutasi EMS dengan waktu inkubasi 60 menit. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada jamur tiram cokelat, penambahan waktu inkubasi mutagen memengaruhi penurunan produksi  $\beta$ -glukan yang merupakan komponen EPS.

Penurunan kadar  $\beta$ -glukan yang diperoleh pada penelitian diperkirakan terjadi karena pengaruh mutasi EMS. Keller (1983: 581) melaporkan bahwa dari 85 isolat mutan yang didapat setelah pemberian mutagen kimia EMS pada kapang *Claviceps purpurea*, hanya terdapat satu isolat yang menunjukkan peningkatan produksi senyawa alkaloid. Hal tersebut membuktikan bahwa mutagenesis oleh mutagen kimia tidak selalu menghasilkan mutan dengan kemampuan peningkatan produksi senyawa yang diinginkan.

Menurut Barrasa *dkk.* (1998: 326), EPS jamur tiram cokelat tersusun atas 87% glukosa, 11% manosa, dan 2% galaktosa. Penurunan kadar *crude*  $\beta$ -glukan pada EPS jamur tiram cokelat setelah perlakuan mutasi diperkirakan terjadi karena EMS tidak memengaruhi ekspresi gen-gen penyandi  $\beta$ -glukan, melainkan memengaruhi ekspresi gen-gen penyandi komponen EPS yang lain. Hasil serupa dilaporkan oleh Mehta *dkk.* (2003: 4044) yang menunjukkan bahwa mutasi N-metil-N-nitrosoguanidin (NTG) pada *Blakeslea trispora* berhasil meningkatkan produksi karoten, tetapi mengubah persentase komponen karoten seperti likopen,  $\beta$ -karoten, dan  $\alpha$ -

karoten. Hal tersebut membuktikan bahwa mutasi acak oleh mutagen kimia seperti EMS dan NTG mempengaruhi gen lain di luar gen target.

#### **E. PERTUMBUHAN, PRODUKSI EPS, DAN KADAR $\beta$ -GLUKAN PADA EPS JAMUR TIRAM COKELAT SETELAH PERLAKUAN EMS 15 $\mu$ l/ml PADA BERBAGAI WAKTU INKUBASI**

Pertumbuhan pada mikroorganisme didefinisikan sebagai penambahan populasi atau koloni mikroorganisme (Bauman 2004: 168). Kecepatan pertumbuhan miselium dari seluruh isolat pada penelitian tidak dapat diperhitungkan secara statistik karena waktu pemanenan miselium tidak dilakukan pada jangka waktu yang sama. Namun demikian, grafik rerata berat kering miselium menunjukkan bahwa produksi miselium mutan jamur tiram coklat lebih besar dibandingkan kontrol. Peningkatan produksi miselium seiring dengan penambahan waktu inkubasi EMS. Peningkatan tertinggi dihasilkan oleh isolat TCMK4 yang diperkirakan mengalami mutasi sehingga fase lag lebih singkat dan produksi miselium hari ke-3 meningkat 492% dari kontrol.

Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian perlakuan variasi inkubasi EMS dan waktu inkubasi pertumbuhan miselium terhadap berat kering miselium jamur tiram coklat. Uji Saphiro-Wilk menunjukkan normalitas data berat kering miselium, sedangkan uji Levene menunjukkan bahwa data tersebut bervariasi homogen (Lampiran 5 dan 6). Uji ANOVA dua faktor dengan pengulangan pada taraf kepercayaan 95%

menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian variasi inkubasi mutagen EMS terhadap berat kering miselium dari seluruh isolat mutan (Lampiran 7). Pengujian LSD menunjukkan bahwa produksi miselium isolat TCMK4 berbeda nyata dengan isolat lain, sedangkan produksi miselium isolat kontrol (tanpa perlakuan EMS), TCMK1, TCMK2, dan TCMK3 tidak berbeda nyata (Lampiran 8).

Analisis isozim menggambarkan perubahan karakteristik pertumbuhan jamur tiram coklat setelah perlakuan EMS. Perubahan pembentukan pita isozim pada tiga enzim penanda MDH, ACP, dan PER dihasilkan oleh isolat TCMK4 (Tabel 5). Perbedaan ekspresi pita isozim menunjukkan bahwa secara molekular suatu organisme berbeda dengan *wild-type* sehingga dapat disebut sebagai mutan. Berdasarkan data dari tiga enzim penanda dan berat kering miselium, isolat TCMK4 diperkirakan sebagai mutan dari jamur tiram coklat akibat perlakuan mutagen EMS.

Analisis statistik dari data berat kering EPS dari seluruh mutan jamur tiram coklat menunjukkan distribusi yang normal dan bervariansi homogen (Lampiran 9 dan 10). Menurut Sudjana (1996: 302--305), analisis data dilanjutkan dengan uji ANOVA pada tingkat kepercayaan 0,05 untuk menentukan adanya pengaruh perlakuan (Lampiran 11). Hasil analisis data berat kering EPS tiram coklat menghasilkan signifikansi sebesar 0,0009. Hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan nilai  $\alpha$  sebesar 0,05, sehingga disimpulkan perlakuan variasi inkubasi mutagen EMS berpengaruh

terhadap produksi EPS pada jamur tiram cokelat. Berdasarkan uji LSD, produksi EPS dari seluruh isolat saling berbeda nyata (Lampiran 12).

Kadar  $\beta$ -glukan dari kelima isolat (isolat kontrol dan empat isolat hasil mutasi) menunjukkan distribusi data normal dan variansi data homogen (Lampiran 13 dan 14). Hasil perhitungan ANOVA pada kadar  $\beta$ -glukan jamur tiram cokelat menghasilkan nilai signifikansi sebesar 0,0003 (Lampiran 15). Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan nilai  $\alpha$  (0,05) sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian variasi waktu inkubasi EMS pada jamur tiram cokelat berpengaruh terhadap kadar  $\beta$ -glukan yang terkandung dalam EPS melalui mekanisme mutasi. Berdasarkan uji LSD, produksi  $\beta$ -glukan pada EPS dari lima isolat jamur tiram cokelat menunjukkan perbedaan yang nyata (Lampiran 16).

Pemberian mutagen kimia EMS menyebabkan mutasi secara acak pada rantai DNA sehingga dapat diperoleh isolat mutan dengan perubahan produksi metabolit (Leger *dkk.* 1990: 2697). Perubahan akibat mutasi berupa peningkatan atau penurunan produksi metabolit dipengaruhi oleh mekanisme perbaikan DNA yang terjadi (Leger *dkk.* 1990: 2693--2696). Berdasarkan penelitian yang dilakukan, peningkatan produksi EPS sebesar 28% dihasilkan isolat TCMK4 yang diperoleh dari perlakuan EMS konsentrasi 15  $\mu$ /ml selama 60 menit. Kandungan *crude*  $\beta$ -glukan pada EPS dari isolat TCMK4 mengalami penurunan sebesar 40% dibandingkan kontrol. Penurunan diduga terjadi karena mutasi acak oleh mutagen EMS pada gen penyandi komponen EPS yang lain sehingga perubahan produksi diperkirakan terjadi



pada komponen EPS tersebut. Peningkatan produksi EPS pada jamur tiram coklat setelah perlakuan EMS masih rendah sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan berupa perlakuan mutasi kembali atau melalui perlakuan dengan mutagen lain untuk mendapatkan isolat dengan peningkatan produksi yang optimal.

