

## BAB III

### BAHAN DAN CARA KERJA

#### A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong dan Laboratorium Bioteknologi Tumbuhan, IPB, Bogor. Penelitian dilakukan selama sembilan bulan dari bulan Juni 2007--Februari 2008.

#### B. BAHAN

##### 1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah biakan jamur tiram cokelat koleksi ruang kultur Laboratorium Teknologi Bioteknologi, Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong yang ditumbuhkan pada cawan petri berisi medium PDA.

##### 2. Medium

Medium yang digunakan adalah *potato dextrose agar* (PDA) [Oxoid], dengan komposisi: ekstrak kentang 40 g, glukosa 10 g, agar 15 g, dan medium *potato dextrose broth* (PDB) [BD], dengan komposisi: ekstrak kentang 20 g, dan glukosa 6,5 g.

### 3. Bahan kimia

Bahan kimia habis pakai yang digunakan adalah kloramfenikol [Phapros],  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  [Merck],  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [Merck],  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [Merck], gliserol 99,5% [Merck], etanol *pure analyst* [Merck], larutan *ethyl methane sulfonate* (EMS) 98% *pure-analyst* [Sigma], metanol [Sigma], minyak imersi, NaOH [Merck], *congo red* [Sigma], spiritus, nitrogen cair, pati kentang [Sigma], pasir kuarsa, kertas saring Whatman no. 1, L-asam askorbat [Sigma], L-sistein [Merck], triton-X-100 [Sigma], polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40) [Sigma], L-histidin monohidrat [Merck], asam sitrat monohidrat [Merck], tris-hidroksimetil aminometan [Sigma], 1-naftil asetat [Sigma], 2-naftil asetat [Sigma], aseton [Sigma], *fast blue RR salt* [Sigma], natrium asetat [Sigma],  $\text{CaCl}_2$  [Sigma],  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% [Sigma], 3-amino-9-etilkarbasol [Sigma], bromofenol biru, *nicotinamide dinucleotide* (NAD) [Sigma], asam malik [Sigma], *nitro blue tetrazolium* (NBT) [Sigma], *penhazine meto sulphat* (PMS) [Sigma], tris-HCl [Sigma], Na-1-naftil asam fosfatase [Sigma], MgCl [Sigma], *fast Garnet GBG salt* [Sigma], Na-asetat [Sigma], substrat AAT [Sigma], *fast blue BB salt* [Sigma], asam  $\alpha$ -ketoglutarat [Sigma], L-asam aspartat [Sigma], EDTA [Sigma],  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  [Sigma], dan akuades.

### 4. Peralatan

Alat-alat yang digunakan adalah: Erlenmeyer 500 dan 300 ml [Iwaki], cawan petri [Iwaki], sudip, pembakar spiritus, plastik *wrap* [Klin pak], kertas

aluminium [Klin pak], kertas tisu, kertas label, penggaris, pinset, tusuk gigi, pipet pasteur, gelas objek [Microscope], gelas penutup, *laminar air flow* [ESCO], timbangan digital [Precisa], mikroskop [Boeco], inkubator [Mettler], autoklaf [Iwaki ACV-2450], mesin sentrifugasi [Hitachi], sonikator [Hitachi], kamera digital [Olympus], *shaker incubator* [Kühler], oven [Mettler], lemari pendingin [Sharp], *ultraflow freezer* [Nuaire], tabung nitrogen cair [Jencons], dasaran neon [Schutt], pompa vakum [Pharmacia Biotech], pH meter [Istek], mortar, pinset, perlengkapan kering beku (*freeze dry*) [Snijders Scientific], perlengkapan elektroforesis gel [Advantec], sumber arus listrik [E-C Aparatus Corporation EC 135], spektrofotometer [Hitachi], *hot plate magnetic stirrer* [Bibby], tabung sentrifugasi 1,5 ml; 15 ml [Eppendorf], *tips* [Finntips], pipet mikro 2--20 µl; 20--200 µl; 1.000 µl [Eppendorf], dan peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

### C. CARA KERJA

#### 1. Pembuatan medium, dapar, dan larutan

Pembuatan medium, dapar, dan larutan dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 2. Sterilisasi larutan, alat, dan medium

Sterilisasi semua larutan, alat, dan medium dilakukan dengan autoklaf suhu 121° C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. *Laminar air-flow*

disterilisasi dengan penyemprotan alkohol 90% dan pemajanan sinar UV selama 15 menit sebelum dan sesudah digunakan.

### 3. Peremajaan biakan jamur tiram

Peremajaan biakan dikariotik jamur tiram koleksi Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT, Serpong dilakukan menurut Djajanegara (2004: 11). Medium agar PDA yang ditumbuhi miselium jamur tiram dipotong sebesar  $(0,5 \times 0,5) \text{ cm}^2$  dengan spatel steril. Pemotongan dilakukan pada bagian koloni yang sedang aktif membelah, yaitu bagian tepi koloni. Potongan miselia diinokulasikan ke medium PDA steril yang baru dengan meletakkannya pada bagian tengah cawan petri. Inkubasi dilakukan pada inkubator statis dengan suhu  $29^\circ \text{ C}$  hingga miselium memenuhi seluruh permukaan medium (10 hari). Biakan yang telah diremajakan disubkultur setiap 3 bulan sekali ke medium PDA yang baru dengan teknik yang sama.

### 4. Penyiapan kultur kerja

Pembuatan kultur kerja jamur tiram dilakukan menurut Eichlerova & Homolka (1999: 322). Bagian tepi koloni biakan dikariotik jamur tiram dalam fase eksponensial atau berumur 7 hari pada medium PDA dipotong sebesar  $2 \times (0,5 \times 0,5) \text{ cm}^2$ , kemudian diinokulasikan ke Erlenmeyer berukuran 300 ml yang berisi 30 ml medium PDB steril baru. Kultur tersebut diinkubasi pada inkubator statis dengan suhu  $29^\circ \text{ C}$  hingga mencapai awal fase eksponensial (5 hari) (El Khobar 2006: 36). Kultur pada awal fase eksponensial

difragmentasi dengan ultrasonikator selama 60 menit, kemudian diambil sebanyak 300 µl dan disubkultur ke medium PDB steril yang baru. Subkultur jamur tiram diinkubasi pada inkubator statis dengan suhu 29° C selama 5 hari.

#### 5. Perlakuan *ethyl methane sulfonate* (EMS) dengan variasi konsentrasi

Prosedur mutasi secara kimiawi jamur tiram cokelat dilakukan dengan modifikasi Stonesifer & Baltz (1985: 1180--1181) dan Srikrai & Robbers (1983: 1166). Kultur kerja pada awal fase eksponensial (berumur 5 hari) difragmentasi dengan ultrasonikator selama 60 menit. Kultur kemudian dipindahkan ke tabung sentrifugasi 15 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambah dapar fosfat 0,1 M, pH 7,0 sebanyak jumlah volume supernatan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm, 15 menit pada suhu 4° C. Pemberian dapar fosfat dilakukan sebanyak dua kali.

Suspensi miselium dan dapar fosfat selanjutnya diambil sebanyak 1 ml lalu dipindahkan ke tabung sentrifugasi 1,5 ml dengan menggunakan mikropipet. Tabung kemudian disentrifugasi 8.000 rpm, 15 menit, 4° C. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensikan kembali dengan 1 ml dapar fosfat 0,1 M, pH 7,0. Sebanyak 8, 15, 20, 25, dan 30 µl EMS 98% *pure analyst* ditambahkan pada suspensi miselium dan diinkubasi pada *shaker incubator* berkecepatan 150 rpm selama 60 menit, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4° C.

Supernatan kemudian dibuang pada larutan 0,4 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  untuk menonaktifkan mutagen EMS, sedangkan pelet miselium diresuspensi dengan 1 ml dapar fosfat 0,1 M, pH 7,0. Resuspensi dengan dapar fosfat tersebut dilakukan sebanyak tiga kali untuk membilas sisa EMS. Suspensi miselium dengan dapar fosfat selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4° C. Pelet miselium kemudian diresuspensi dengan 1 ml akuades steril dan divorteks. Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  suspensi pelet disebar pada medium PDA dengan tiga kali pengulangan, kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang. Rasio kematian dari masing-masing konsentrasi dihitung pada hari ke-5. Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 2. Konsentrasi dengan rasio kematian 98--99% selanjutnya digunakan untuk perlakuan EMS dengan variasi waktu inkubasi.

#### 6. Perlakuan EMS dengan variasi waktu inkubasi

Mutasi kembali dilakukan pada jamur tiram cokelat *wild-type*. Prosedur kerja mutagenesis perlakuan EMS dengan variasi konsentrasi sama dengan prosedur perlakuan EMS pada variasi konsentrasi. Pemberian mutagen EMS dengan konsentrasi 15  $\mu\text{l}/\text{ml}$  menunjukkan rasio kematian 98--99% sehingga digunakan kembali untuk perlakuan mutasi EMS dengan variasi waktu inkubasi selama 20, 40, dan 60 menit, serta satu perlakuan EMS tanpa waktu inkubasi (menit ke-0). Kisaran waktu inkubasi tersebut mengacu pada penelitian Mehta *dkk.* (2003: 4044).

## 7. Penentuan berat kering miselium

Pengukuran berat kering miselium dilakukan sesuai Maziero *dkk.* (1999: 78). Sebanyak 3 x (0,5 x 0,5) cm<sup>2</sup> jamur tiram coklat hasil mutasi EMS yang ditumbuhkan pada medium PDA diinokulasikan ke dalam lima Erlenmeyer 300 ml berisi 30 ml medium PDB. Kultur diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm selama 3, 6, 10, 14, dan 20 hari. Waktu inkubasi mewakili fase pertumbuhan jamur tiram yang mengacu pada penelitian El Khobar (2006: 36). Pemisahan pelet miselium dengan filtrat kultur dilakukan pada akhir waktu inkubasi dengan metode penyaringan menggunakan kertas saring Whatman no.1. Pelet miselium selanjutnya dikeringkan pada oven bersuhu 29° C hingga mencapai berat konstan atau selama satu hari. Pengambilan data tersebut dilakukan dengan tiga ulangan.

## 8. Analisis isozim

Prosedur analisis isozim dilakukan sesuai dengan Wendel & Weeden (1989: 10--35), Djajanegara *dkk.* (2004: 11), dan Octavia (2004: 31) yang meliputi:

### a. Pembuatan bubuk jamur dan ekstrak enzim

Miselium jamur tiram coklat kontrol serta mutan diperbanyak pada medium PDB. Miselium yang berumur 6 hari dipisahkan dari medium dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring, kemudian dikeringkan hingga

mencapai berat konstan (29° C selama 1 hari). Miselium selanjutnya dibekukan dengan merendam miselium pada nitrogen cair selama 2--3 menit, kemudian dikeringbekukan selama 16 jam. Pelet miselium kemudian dihaluskan dalam mortar sampai membentuk bubuk miselium. Ekstraksi enzim yang terdapat pada bubuk miselium dilakukan dengan menggerus bubuk miselium dan pasir kuarsa di dalam mortar yang berisi dapar pengestrak. Selanjutnya kertas saring Whatman no.1 berukuran (0,5 x 0,5) cm<sup>2</sup> direndam dalam ekstrak enzim jamur tiram coklat dan didiamkan beberapa saat hingga ekstrak meresap (Octavia 2004: 31).

#### b. Pembuatan gel-pati

Sebanyak 20 g pati dilarutkan dengan sepertiga bagian dari 200 ml dapar gel lalu diaduk hingga homogen dan membentuk larutan pati. Dua pertiga bagian dari dapar gel lainnya dipanaskan hingga mendidih menggunakan *hotplate*, kemudian larutan pati dicampurkan dan dididihkan kembali hingga berwarna bening. Campuran tersebut kemudian diangkat dan divakum dengan aspirator untuk menghilangkan gelembung udara. Gel selanjutnya segera dituang ke dalam cetakan yang telah diolesi minyak parafin dan bagian kaki-kakinya ditutupi selotip. Gel kemudian disimpan pada suhu ruang dan dimasukkan ke dalam refrigerator suhu 5° C sesaat sebelum digunakan. Bagian tengah gel selanjutnya dicetak dengan sisir cetak hingga terbentuk dua bagian gel yang berukuran sama. Bagian yang



dicetak merupakan sumur untuk meletakkan sampel (Wendel & Weeden 1989: 13--14; Djajanegara *dkk.* 2004: 11).

c. Elektroforesis gel-pati

Kertas saring sebesar (0,5 x 0,5) cm<sup>2</sup> direndam di larutan bromofenol biru dan diletakkan pada sumur pertama sebagai penanda jalannya elektroforesis. Masing-masing kertas saring yang telah direndam pada ekstrak enzim dari masing-masing sampel kemudian diletakkan di sumur gel selanjutnya dengan bantuan pinset. Gel kemudian diletakkan di alat elektroforesis yang telah diberi dapar elektroda. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 V pada suhu 5° C selama 4 jam (Wendel & Weeden 1989: 15).

d. Pewarnaan gel dan dokumentasi

Gel yang telah dielektroforesis dikeluarkan dan dipotong menjadi 4 bagian horizontal menggunakan *gel slicer*. Masing-masing gel direndam ke dalam pewarna enzim peroksidase (PER), fosfatase asam (ACP), aspartat aminotransferase (AAT), dan dehidrogenase malat (MDH) (komposisi pewarna dapat dilihat pada Lampiran 1). Perendaman gel dilakukan selama 4--6 jam. Gel yang telah direndam selanjutnya dicuci dengan air mengalir hingga sisa pewarna hilang, kemudian diamati dengan bantuan lampu tabung (*tube lamp*). Hasil pengamatan kemudian didokumentasikan dengan kamera dan di

analisis dengan melihat jumlah pita yang terbentuk (Wendel & Weeden 1989: 13--17; Djajanegara *dkk.* 2004: 11).

#### 9. Isolasi EPS dari filtrat kultur

Isolasi EPS dilakukan sesuai prosedur Eberendu *dkk.* (1994: 5--6), yaitu dengan pengendapan filtrat kultur. Kultur jamur tiram coklat yang telah diberi perlakuan EMS diperbanyak dengan metode subkultur ke medium PDB. Kultur diinkubasi selama 14 hari atau hingga mencapai fase stasioner. Pemisahan miselium dan medium yang diduga mengandung EPS, dilakukan pada akhir waktu inkubasi (hari ke-14) dengan metode penyaringan pelet miselium menggunakan kertas saring Whatman no.1. Filtrat kemudian diendapkan dengan menambahkan etanol 80% sebanyak dua kali volume filtrat. Pengendapan dengan etanol dilakukan selama 24 jam pada suhu 4° C. Campuran filtrat dan etanol selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4° C. Supernatan dibuang, kemudian pelet EPS dikeringkan dengan oven pada suhu ruang (29° C) selama satu hari atau hingga berat kering konstan.

#### 10. Penentuan kadar *crude* $\beta$ -glukan pada EPS jamur tiram

Prosedur penentuan kadar *crude*  $\beta$ -glukan sesuai dengan Eberendu *dkk.* (1994: 5--6). Kurva standar  $\beta$ -glukan dibuat dengan melarutkan  $\beta$ -glukan standar dengan akuades hingga mencapai konsentrasi

3,5% (w/v). Sebanyak 10 ml larutan  $\beta$ -glukan 3,5% (w/v) dibuat dengan menambahkan 0,35 mg bubuk  $\beta$ -glukan standar ke dalam 10 ml akuades. Larutan tersebut dilarutkan kembali dengan akuades hingga mencapai konsentrasi 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, dan 35.000 ppm (Lampiran 3). Sebanyak 400  $\mu$ l dari masing-masing larutan ditambah 100  $\mu$ l reagen *congo red*  $2 \cdot 10^{-4}$  M dan 500  $\mu$ l larutan NaOH 0,2 M. Absorbansi dari masing-masing campuran diamati pada panjang gelombang 540 nm. Angka absorbansi sebagai sumbu y dan variasi konsentrasi larutan  $\beta$ -glukan 3,5% w/v sebagai sumbu x sehingga didapat persamaan kurva  $y = ax + b$ .

Nilai absorbansi *crude*  $\beta$ -glukan ditentukan dengan prosedur yang sama pada prosedur penentuan kurva standar  $\beta$ -glukan. Kadar *crude*  $\beta$ -glukan pada EPS jamur tiram coklat diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi pada kurva standar  $\beta$ -glukan (Lampiran 4). Pengulangan pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali. Angka absorbansi dari mutan jamur tiram selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar  $\beta$ -glukan untuk menghitung kadar *crude*  $\beta$ -glukan.

Skema kerja penelitian secara umum dapat dilihat pada Gambar 7.

#### **D. PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA**

Penelitian bersifat eksperimental dengan empat kelompok perlakuan berdasarkan variasi waktu inkubasi pemberian EMS konsentrasi optimal (0, 20, 40, dan 60 menit). Penentuan konsentrasi optimal berdasarkan perhitungan rasio kematian setelah perlakuan EMS variasi konsentrasi 8, 15,

20, 25, dan 30  $\mu\text{l/ml}$ . Seluruh isolat jamur tiram cokelat yang didapat kemudian diuji secara kuantitatif untuk mengamati pengaruh perlakuan yang diberikan.

Data kuantitatif yang diperoleh berupa berat kering miselium, jumlah ekspresi pita isozim dari enzim penanda MDH, AAT, ACP, dan PER, berat kering EPS, dan kadar  $\beta$ -glukan pada EPS. Analisis data dilakukan dengan membandingkan data-data dari isolat jamur tiram cokelat yang diperoleh setelah perlakuan EMS dengan isolat kontrol. Data berat kering miselium, berat kering EPS dan kadar  $\beta$ -glukan pada EPS diuji secara statistik untuk menentukan adanya pengaruh perlakuan EMS.

Uji Saphiro-Wilk dilakukan untuk melihat normalitas data, sedangkan uji Levene dilakukan untuk melihat homogenitas varians data (Conover 1980: 299--302). Uji ANOVA dua faktor dengan pengulangan dilakukan untuk data berat kering miselium, sedangkan data uji ANOVA satu faktor dilakukan pada data berat kering EPS dan kadar *crude*  $\beta$ -glukan jika data berdistribusi normal dan bervariansi homogen (Sudjana 1996: 302--305). Adanya pengaruh pada uji ANOVA dilanjutkan dengan pengujian *multiple comparison* menggunakan uji LSD (*least significance difference*) untuk menentukan perbedaan antar isolat akibat perlakuan EMS (Zar 1974: 151).