

## BAB III METODE PENELITIAN

### A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen serta menggunakan desain penelitian *Statistic Grup Comparison*. Kegiatan pengumpulan data yang dilakukan peneliti berdasarkan hasil pengamatan, kepustakaan dan dokumentasi. Adapun untuk variabel bebas yang digunakan yaitu media alternatif tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) 5 konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70% dan media PDA instan (Oxoid) sebagai kontrol sementara itu pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* sebagai variabel terikat. Pemeriksaan menggunakan metode *single dot* dengan mengamati diameter pertumbuhan koloni jamur *Aspergillus flavus* pada media alternatif tepung umbi porang dengan 5 konsentrasi dan media PDA instan (Oxoid). Dengan menggunakan rumus  $(t - 1) (r - 1) \geq 15$  didapatkan 4 kali pengulangan.

### B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei – Juni 2023 bertempat di Laboratorium Parasitologi (Mikologi) Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

### C. Subjek Penelitian

Penelitian ini mempunyai subjek yaitu media alternatif tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) 5 konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70% dan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid) sebagai kontrol. Strain murni jamur *Aspergillus flavus* didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Universitas Indonesia dan dilakukan peremajaan jamur *Aspergillus flavus* dari strain murni yang dinokulasikan di media PDA instan (Oxoid) di Laboratorium Mikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

## D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel Bebas					
	a. Media Alternatif Tepung Umbi Porang ( <i>Amorpho phallus muelleri</i> )	Media yang digunakan sebagai media alternatif PDA pada pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i> yang terbuat dari tepung umbi porang organik instan (karbohidrat), Dextrose, dan Agar. 5 konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70%	Penimbangan	Neraca analitik	Media alternatif tepung umbi porang konsentrasi	Ordinal 5
	b. Media PDA ( <i>Potato Dextrose Agar</i> ) Oxid sebagai kontrol	Media pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i> yang diperkaya karbohidrat. Komposisi media PDA (Oxoid) yaitu Potato (Karbohidrat), Glukosa, dan Agar.	Penimbangan	Neraca analitik	Media PDA ( <i>Potato Dextrose Agar</i> ) instan (Oxoid)	Nominal
2	Variabel terikat					
	Pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i>	Jamur <i>Aspergillus flavus</i> yang tumbuh pada media PDA ( <i>Potato Dextrose Agar</i> ) instan (Oxoid) dan media alternatif tepung umbi porang	Mengetahui diameter pertumbuhan menggunakan jangka sorong	Jangka Sorong	Diameter pertumbuhan (mm)	Ratio

## E. Pengumpulan Data

### 1. Pendahuluan

- a. Menyiapkan peralatan dan bahan yang akan digunakan selama penelitian.
- b. Menggunakan rumus federer (1963) jumlah sampel penelitian akan ditentukan dalam (Irmawartini dan Nurhaedah, 2017)

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

Keterangan :

t : *Treatment* atau perlakuan

r : *replikasi* atau pengulangan

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(6 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(5)(r - 1) \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$r \geq 20 / 5$$

$$r \geq 4$$

### c. Identifikasi strain jamur *Aspergillus flavus*

- 1) Biakan jamur *Aspergillus flavus* akan ditanam pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan metode *single dot* kemudian inkubasi di inkubator  $5 \times 24$  jam pada suhu  $37^{\circ}$  C (Keliangin, 2018)
- 2) Setelah diinkubasi selama 5 hari jamur *Aspergillus flavus* diamati secara makroskopis meliputi warna, bentuk, permukaan koloni (Keliangin, 2018).
- 3) Secara makroskopis, jamur *Aspergillus flavus* memiliki ciri khas warna hijau – hijau kekuningan, permukaan seperti kapas, tidak ada garis radial atau konsentris dan tidak ada tetesan eksudat. *Aspergillus flavus* (Saputri, 2018) bentuk koloni granular dan kompak. Koloni yang masih muda berwarna putih dan warnanya berubah menjadi hijau – hijau kekuningan setelah membentuk konidia (Putra dkk, 2020)
- 4) Melakukan pengujian mikroskopis dengan pewarnaan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*) dengan cara meneteskan pada objek glass yang sudah

diletakan sampel lalu tutup dengan dack glass dan hindari gelembung udara (Keliangin, 2018)

- 5) Lalu lakukan pengamatan mikroskopis jamur *Aspergillus flavus* dengan mikroskop dimulai dari perbesaran rendah  $10\times 10$  sampai  $10\times 100$  untuk melihat karakteristik vesikel, konidia, kondiofor (Keliangin, 2018).
- 6) Secara mikroskopis *Aspergillus flavus* memiliki kondiofor yang panjang (400 - 800  $\mu\text{m}$ ) dan relatif kasar, bentuk kepala konidial bervariasi dari bentuk kolumnar, radial, dan pola, hifa septum, dan koloni kompak (Saputri, 2018) vesikel (1) yang berbentuk bulat hingga lonjong dengan diameter 25 - 45  $\mu\text{m}$ . Konidianya (2) berbentuk bulat dan berdiameter 3-6  $\mu\text{m}$ , serta konidiofornya (3) panjang dan berbentuk silinder (Putra dkk, 2020)

## 2. Tahap Persiapan dan Pembuatan Media

### a. Alat

Autoklaf, Alumunium foil, Batang pengaduk, Cawan petri, Corong glass, Erlenmeyer 250 ml, *Beaker glass* 250 ml, Gelas ukur 100 ml, Pipet ukur, Blender, Hotplate, Indikator pH universal, Inkubator, Jangka sorong, Objek glass, *Deck glass*, Kain kasa, Kapas, Kertas kopi, Lakban, Lampu spiritus, Mikroskop, Neraca elektrik, Oven, Jarum Ose, Spidol, dan Label.

### b. Bahan

Biakan murni jamur *Aspergillus flavus*, Media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid), Tepung Umbi Porang (*Amorphophallus muelleri*) organik instan, Dextrose, Agar batang, Cat LCB (*Lactophenol Cotton Blue*), HCl, NaOH, Antibiotik *Chloramphenicol*, Aquades.

## 3. Metode Pemeriksaan

Eksperimen dengan metode *single dot*

## 4. Prinsip Pemeriksaan

Media alternatif tepung umbi porang diberikan perlakuan konsentrasi lalu akan diinokulasikan jamur *Aspergillus flavus* dengan cara menusukannya

pada tengah permukaan media (*Single Dot*) dengan media PDA instan (Oxoid) sebagai kontrol.

## 5. Cara Kerja

### a. Proses sterilisasi

Dalam penelitian ini akan menggunakan alat-alat gelas, sebelum proses steril. Alat-alat gelas akan dicuci bersih dan dikeringkan lalu akan disterilkan dengan metode steril kering menggunakan oven selama 60 menit dengan suhu 160° C.

### b. Pembuatan larutan *chloramphenicol*

400 mg *chloramphenicol* diperlukan untuk 1000 ml PDA, setiap 250 mg *chloramphenicol* akan dicampurkan kedalam NaCl 0,85%

Jadi 400 mg *chloramphenicol* akan memerlukan NaCl 0,85% sebanyak

$$\frac{4000 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}.$$

### c. Pembuatan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid)

- 1) Menggunakan neraca elektrik akan ditimbang 9,75 gr bubuk media PDA instan (Oxoid) masukkan bubuk kedalam erlenmeyer lalu tambahkan 250 ml aquades.
- 2) Media dilarutkan dengan cara dipanaskan diatas hotplate hingga larut.  
Sumber : Etiket prosedur pembuatan media PDA instan (Oxoid)
- 3) Kemudian ukur pH larutan menggunakan indikator pH universal, jika pH terlalu asam dapat ditambahkan NaOH 0,01 N (tetesan ) dan jika pH terlalu basa dapat ditambahkan HCl 0,01 N (tetesan) sampai pH yang diinginkan.  
Ukur kembali pH hingga pH ± 5,5.
- 4) Disterilkan menggunakan autoklaf (steril basah) pada suhu 121° C dengan tekanan 1 – 2 atm selama 15 menit.
- 5) Diamkan larutan hingga suhu menurun, lalu ditambahkan antibiotik *chloramphenicol* 2,5 ml, lalu homogenkan.
- 6) Media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid) dituang 10 – 20 ml kedalam cawan petri steril secara aseptis.

- d. Pembuatan media alternatif tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*)
- 1) Siapkan bahan yang meliputi tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) organik instan, dextrose, dan agar batang.
  - 2) Siapkan satu gelas ukur 250 ml serta lima erlenmeyer 250 ml.
  - 3) Tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) organik instan digiling kembali di mortar untuk memastikan tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) organik instan benar-benar halus.
  - 4) Tepung Umbi Porang (*Amorphophallus muelleri*) organik instan, Dextrose, dan Agar batang akan ditimbang berdasarkan konsentrasi (50%, 55%, 60%, 65%, 70%), lalu akan dimasukkan kedalam masing-masing erlenmeyer 250 ml.

Menggunakan rumus :

$\text{Massa zat 250 ml} : \% (\text{desimal}) \times \text{massa bahan media PDA (250 ml)}$
--

Sumber : Modifikasi (Aufa, 2022)

Tabel 3.2 Penimbangan Bahan Pembuat Media Alternatif Tepung Umbi Porang

No	Variasi Konsentrasi	Tepung Umbi Porang ( <i>Amorphophallus muelleri</i> ) organik instan	Dextrose	Agar
1	50%	0,5 gram	2,5 gram	1,875 gram
2	55%	0,55 gram	2,75 gram	2,062 gram
3	60%	0,6 gram	3 gram	2,25 gram
4	65%	0,65 gram	3,25 gram	2,437 gram
5	70%	0,7 gram	3,5 gram	2,625 gram

- 5) Lakukan penambahan 250 ml aquades, lalu larutkan dengan cara dipanaskan diatas hot plate hingga larut.
- 6) Kemudian ukur pH larutan menggunakan indikator pH universal, jika pH terlalu asam dapat ditambahkan NaOH 0,01 N (tetesan) dan jika pH terlalu basa dapat ditambahkan HCl 0,01 N (tetesan) sampai pH yang diinginkan. Ukur kembali pH hingga  $\text{pH} \pm 5,5$ .
- 7) Panaskan kembali hingga tercampur rata setelah itu angkat dan erlenmeyer ditutup menggunakan alumunium foil yang didalamnya terdapat kapas.

- 8) Media yang sudah homogen distrelilkan dengan metode strelil basah menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 – 2 atm.
  - 9) Turunkan suhu lalu tambahkan antibiotik *chloramphenicol* sebanyak 2,5 ml kemudian homogenkan.
  - 10) Media alternatif tepung umbi porang dituangkan 15 – 20 ml ke dalam masing-masing cawan petri streil secara aseptis, lalu tunggu hingga memadat.
- e. Pengujian
- a) Makroskopis
    - 1) Jamur *Aspergillus flavus* diinokulasi pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid) dan media alternatif tepung umbi porang dextrose agar (*Amorphophallus muelleri*) 5 konsentrasi secara aspetik dengan metode *single dot* kemudian inkubasi di inkubator pada suhu 37° C.
    - 2) Besarnya diameter koloni jamur *Aspergillus flavus* pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid) dan media alternatif tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) 5 konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70% diobservasi setiap hari (hari ke 1 – hari ke 5) dan dilakukan pengukuran diameter pertumbuhan koloni jamur *Aspergillus flavus* hari ke 5 dengan menggunakan jangka sorong dan hasil pengukuran dilaporkan sebagai hasil akhir.
    - 3) Setelah 5 hari inkubasi jamur *Aspergillus flavus* diamati secara makroskopis meliputi warna, bentuk, dan permukaan koloni.  
(Sumber : Keliangin, 2018)
    - 4) Secara makroskopis, jamur *Aspergillus flavus* memiliki ciri khas warna hijau – hijau kekuningan, permukaan seperti kapas, tidak ada garis radial atau konsentris dan tidak ada tetesan eksudat. *Aspergillus flavus* (Saputri, 2018) bentuk koloni granular dan kompak. Koloni yang masih muda berwarna putih dan warnanya berubah menjadi hijau – hijau kekuningan setelah membentuk konidia (Putra dkk, 2020)

b) Mikroskopis

- 1) menyiapkan dua objek glass bersih.
- 2) Diambil satu mata ose dari media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid) dan masing-masing media alternatif tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) dengan 5 konsentrasi lalu ditaruh di objek glass. .
- 3) Lakukan pewarnaan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*) dengan cara diteteskan kemudian tutup dengan *deck glass* (hidari gelembung udara). Kemudian diamati secara mikroskopis meliputi vesikel, konidia, konidiofor.  
(Sumber : Keliangin, 2018)
- 4) Secara mikroskopis *Aspergillus flavus* memiliki konidiofor yang panjang (400 - 800  $\mu\text{m}$ ) dan relatif kasar, bentuk kepala konidial bervariasi dari bentuk kolumnar, radial, dan pola, hifa septum, dan koloni kompak (Saputri, 2018) vesikel (1) yang berbentuk bulat hingga lonjong dengan diameter 25 - 45  $\mu\text{m}$ . Konidianya (2) berbentuk bulat dan berdiameter 3 - 6  $\mu\text{m}$ , serta konidiofornya (3) panjang dan berbentuk silinder (Putra dkk, 2020)

## F. Pengolahan dan Analisis Data

### 1. Pengolahan Data

Data yang didapatkan dengan cara observasi selama 5 hari berupa diameter pertumbuhan koloni jamur *Aspergillus flavus* (mm) diolah dengan cara sebagai berikut :

#### a) Editing

Kegiatan memeriksa kelengkapan dan meneliti data-data yang telah dikumpulkan, terutama dari kelengkapan data observasi baik secara makroskopis (diameter koloni, spora dewasa, spora muda, dan permukaan koloni seperti kapas) dan mikroskopis (vesikel, konidia, konidiofor)

#### b) Coding

Mengubah data dari bentuk kalimat atau huruf untuk dijadikan simbol.



c) *Procesing* (Tabulasi)

Data yang sudah dicoding akan dimasukkan ke dalam program atau software pada perangkat komputer

d) *Cleanning*

Dilakukan pengecekan ulang data yang telah dientry, hal ini bertujuan untuk melihat ada atau tidaknya kemungkinan kesalahan memasukkan data.

2. Analisa Data

Penelitian ini menggunakan analisa data univariat dan analisa bivariat.

- a. Secara univariat data akan diolah dari observasi dan pengujian secara makroskopis dan mikroskopis pada jamur *Aspergillus flavus* yang diinokulasikan di media alternatif tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) dan media PDA instan (Oxoid). Secara makroskopis akan diamati diameter pertumbuhan koloni dan dihitung reratanya pada hari ke 5 dan diamati spora dewasa, spora muda, dan permukaan koloni sedangkan secara mikroskopis akan diamati vesikel, konidia, dan konidiofor jamur *Aspergillus flavus*.
- b. Secara bivariat data akan diolah dari rerata diameter koloni jamur *Aspergillus flavus* pada hari ke 5 dan dianalisis dengan uji *one way annova* dengan syarat terpenuhinya syarat data terdistribusi secara normal dan data terdistribusi secara homogen. Hasil Uji *one way annova* jika terdapat perbedaan yang relevan maka akan dilanjutkan dengan *post hoc test* uji LSD (*Least Significant Difference*) / uji beda nyata terkecil (BNT) dengan taraf kesalahan 5% atau tingkat kepercayaan 95%.

**G. Ethical Clearance**

Penelitian yang dilakukan atas izin komite etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan nomor keterangan etik No.081/KEPK-TJK/II/2023 yang mulai berlaku pada 9 Februari 2023.

Penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan

dalam penanganan limbah, limbah larutan yang dihasilkan dari pembuatan media alternatif tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) dan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid) maupun sisa air perebusan pembuatan media tersebut ditangani dengan cara langsung membuang di saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan tidak membahayakan lingkungan. Limbah plate media alternatif tepung umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) dan plate media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan (Oxoid) setelah dilakukan pengamatan selama 5 hari serta limbah suspensi jamur *Aspergillus flavus* akan dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit dengan ditambahkan sabun dan desinfektan, air bekas rebusan limbah media plate dan suspensi jamur *Aspergillus flavus* dibuang pada saluran pembuangan lalu plate akan dicuci menggunakan detergen pada air mengalir.