

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan *Statistic Grup Comparison* dan merupakan penelitian eksperimen. Peneliti mengumpulkan data berdasarkan hasil observasi, studi literatur, dan dokumentasi pada setiap tahap penelitian yang dilakukan. Penelitian ini meliputi dua jenis variabel yaitu variabel independen penelitian ini adalah media dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dari kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*) sedangkan variabel dependen adalah pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*. kontrol pada penelitian ini yaitu menggunakan media SDA. Pengamatan dilakukan dengan cara melihat diameter koloni pada media yang telah ditanam jamur menggunakan metode *single dot* dengan pengulangan sebanyak 4 kali, ditentukan berdasarkan perhitungan menggunakan rumus federer.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang bulan April - Mei 2025.

C. Subyek Penelitian

Media yang digunakan dalam pertumbuhan jamur adalah subyek dari penelitian ini. Terdiri dari media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dan media dari kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*). Peneliti menggunakan MERCK yang merupakan produk instan dari Media SDA dengan nomor katalog 1.05438.0500. Sementara itu media alternatif yang dipakai dibuat dari kacang merah berkualitas baik, berwarna merah baik yang bercorak maupun tidak, tidak berulat, tidak bau tengik, memiliki biji utuh, dan bertekstur keras. Kacang merah tersebut diolah menjadi tepung dan digunakan untuk membuat media dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25%. Jamur *Aspergillus niger* diperoleh dari Laboratorium PT Agritama Sinergi Inovasi (AGAVI).

D. Variabel dan Oprasional Penelitian

Tabel 3.1 Definisi Oprasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel Bebas					
	a. Media SDA	Media yang dipakai untuk pertumbuhan fungi <i>Aspergillus niger</i> dengan komposisi media yaitu, pepton, dextrose dan agar (Latifah, <i>et al.</i> , 2023)	Penimbangan	Neraca Analitik	1. Tumbuh 2. Tidak tumbuh	Nominal
	b. Media alternatif kacang merah (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Media kultur yang dibuat dari kacang merah berfungsi sebagai media alternatif untuk pertumbuhan jamur dengan komposisi kacang merah, dextrose dan agar, dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25% (Citra, 2021)	Penimbangan	Neraca Analitik	1. Tumbuh 2. Tidak tumbuh	Nominal
2	Variabel Terikat Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i>	Jamur <i>Aspergillus niger</i> yang berkembang di media kacang merah dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25% menghasilkan jamur yang berbulu halus, berwarna hitam dengan tepi yang sedikit putih (sarah <i>et al.</i> , 2023)	Diukur diameter pertumbuhan koloni <i>Aspergillus niger</i>	Jangka sorong	Diameter koloni <i>Aspergillus niger</i> : mm	Ratio

E. Pengumpulan Data

1. Pendahuluan

- a. Membuat surat izin penelitian ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis serta Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dan pemesanan strain jamur *Aspergillus niger* di Laboratorium PT Agritama Sinergi Inovasi (AGAVI)
- b. Dipersiapkan bahan serta peralatan yang dipakai di dalam penelitian.
- c. Rumus Federer dipakai untuk menghitung jumlah sampel

(Lala & Sari, 2023)

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

Keterangan:
t : treatment (perlakuan)
r : replikasi (pengulangan)

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

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

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

$$5r \geq 15 + 5$$

$$r \geq 20/5$$

$$r \geq 4$$

- d. Identifikasi strain jamur *Aspergillus niger*
 - 1) Secara aseptik diinokulasikan strain jamur *Aspergillus niger* ke dalam media SDA menggunakan metode single dot, selanjutnya diatur temperatur ke 37°C lalu di inkubasi selama 24 jam
 - 2) 1 ose koloni diambil dari media SDA.
 - 3) LPCB (*Lactophenol Cotton Blue*) ditetaskan sebagai pewarnaan pada koloni, lalu ditutup menggunakan kaca penutup (tidak boleh ada gelembung udara didalamnya)
 - 4) Selanjutnya, untuk melihat morfologi dari *Aspergillus niger* maka bisa diamati dengan mikroskop pada perbesaran 100x hingga perbesaran 400x (Ramadhani S & Wahyuni, 2020)
- e. Determinasi Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) untuk memastikan bahwa bahan yang digunakan dalam penelitian sesuai dengan spesies yang diinginkan yaitu *Phaseolus vulgaris* L. yang dilakukan di Laboratorium Botani FMIPA Universitas Lampung.

2. Prosedur Pemeriksaan

a. Alat

Autoklaf, Erlenmeyer 250 ml, Blender, Pengaduk batang, Corong gelas, Cawan petri, Alumunium foil, Gelas Ukur 250 ml, pipet ukur, Kertas Kopi, Hot plate, Ose loop dan Jarum, Inkubator, Spidol, Indikator universal, Label, Neraca elektrik, Gelas ukur 100 ml, Lampu spirtus, Kaca Objek, Mikroskop, Oven, Kaca penutup, Lakban, Kapas dan Jangka sorong.

b. Bahan

Media SDA, Strain jamur *Aspergillus niger*, tepung kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*), aquades, agar batang, dextrose, antibiotik kloramfenikol 500 mg dan LPCB.

3. Metode Kerja

Single dot.

4. Prinsip Pemeriksaan

Jamur ditusukkan ke bagian tengah permukaan agar memakai ose jarum.

5. Cara Kerja

a. Sterilisasi alat

Sebelum digunakan dalam penelitian ini, semua peralatan gelas harus dicuci bersih lalu dikeringkan. Setelah itu, disterilkan menggunakan oven suhu 160°C selama 60 menit pada peralatan yang sudah dibungkus memakai kertas kopi.

b. Pembuatan larutan kloramfenikol

500 mg kloramfenikol murni yang dibeli dari apotik yang kemudian dilarutkan dalam 10 ml aquades steril lalu dihomogenkan.

c. Pembuatan modifikasi media kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*)

- 1) Disiapkan 1 buah gelas ukur 250 ml dan Erlenmeyer 250 ml 1 buah.
- 2) Dicuci sebanyak 1 kg kacang merah berkualitas baik, berwarna merah baik yang bercorak maupun tidak, tidak berulat, tidak bau tengik, memiliki biji utuh dan bertekstur keras.

- 3) Dikeringkan kacang merah diatas sinar matahari yang ditutup menggunakan kain hitam agar senyawa nutrisi yang terkandung tidak dirusak oleh sinar matahari serta mempercepat proses pengeringan karena warna hitam dapat menyerap panas dengan baik (Fadhilah et al., 2022).
- 4) Lalu menggunakan penghalus (blender) kacang merah dihaluskan & kemudian diayak.
- 5) Setelah diayak selanjutnya ditimbang sebanyak konsentrasi 5% (1,0 gram), konsentrasi 10% (2,0 gram), konsentrasi 15% (2,4 gram) konsentrasi 20% (3,25 gram) dan konsentrasi 25% (4,1 gram), lalu masing-masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml.
- 6) Kemudian masing-masing ditambahkan agar-agar dan dextrose sebanyak konsentrasi 5% (agar (4,35 gram), dextrose (10,9 gram)), konsentrasi 10% (agar (3,97 gram), dextrose (10,28 gram)), konsentrasi 15% (agar (3,81 gram), dextrose (10,04)), konsentrasi 20% (agar (3,50 gram), dextrose (9,50 gram) dan konsentrasi 25% (agar (3,17 gram), dextrose (8,98 gram)).
- 7) Ditambahkan 250 ml aquades, hingga mendidih direbus di atas hot plate.
- 8) Menggunakan indikator universal, pH yang di hasilkan diukur. Jika hasil pH terlalu tinggi (basa) maka bisa ditetaskan HCl 0,01 N hingga sesuai, jika pH terlalu rendah (asam) maka teteskan NaOH 0,01 N hingga sesuai, lalu diukur kembali pH hingga $pH \pm 5,5$.
- 9) Kemudian homogenkan dengan cara dipanaskan kembali kemudian diangkat dan tutup erlenmeyer memakai kapas alumunium foil.
- 10) Selanjutnya temperatur autoklaf diatur sampai mencapai 121°C , dimasukkan media ke autoklaf dan disterilkan selama 15 menit.
- 11) Dibiarkan sampai temperatur turun kemudian ditambahkan sebanyak 2,5 ml antibiotik kloramfenikol & homogenkan.

- 12) Disiapkan cawan petri yang akan digunakan, selanjutnya secara aseptis media kacang merah dituangkan sebanyak 15-20 ml ke dalam cawan petri kemudian dibiarkan sampai membeku (Citra, 2021).

d. Pembuatan media SDA

- 1) Bubuk media SDA yang akan diaplikasikan ditimbang sebanyak 16,25 gram , lalu di tuangkan ke dalam erlenmeyer selanjutnya di tambahkan 250 ml aquades
- 2) Dipanaskan media hingga mendidih selama 1 menit untuk memastikan pencampuran media sempurna.
- 3) Disetting autoklaf ke temperatur 121°C tekanan 1-2 atm kemudian sterilkan media ke dalamnya selama 15 menit.
- 4) Dibiarkan suhu larutan hingga turun, kemudian tambahkan 2,5 ml antibiotik kloramfenikol dan diaduk hingga homogen.
- 5) Sebanyak 10-20 ml dituangkan media secara aseptik pada cawan petri yang sudah steril lalu dihomogenkan.

Sumber : (Yusmaniar, 2017).

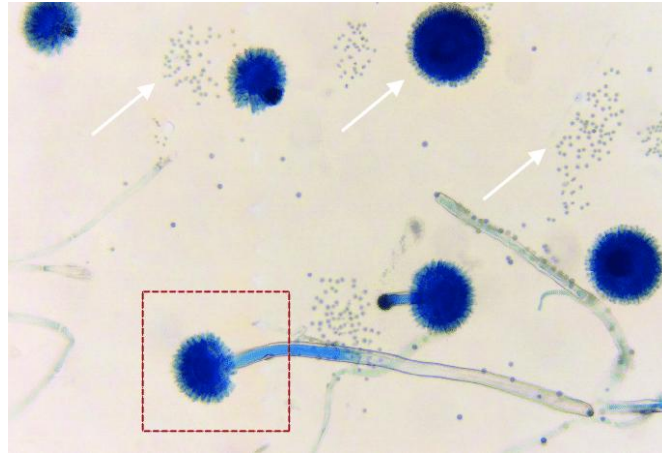
e. Uji penelitian

- 1) Fungi *Aspergillus niger* diinokulasikan secara aseptik pada media SDA dan media modifikasi kacang merah ditusukkan ke tengah agar, lalu diinkubasi di suhu 37°C didalam inkubator.
- 2) Diameter koloni *Aspergillus niger* yang tumbuh dalam media SDA & media modifikasi kacang merah dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, setiap 24 jam selama 5 hari besar diameter diukur dengan jangka sorong.

f. Uji penegasan

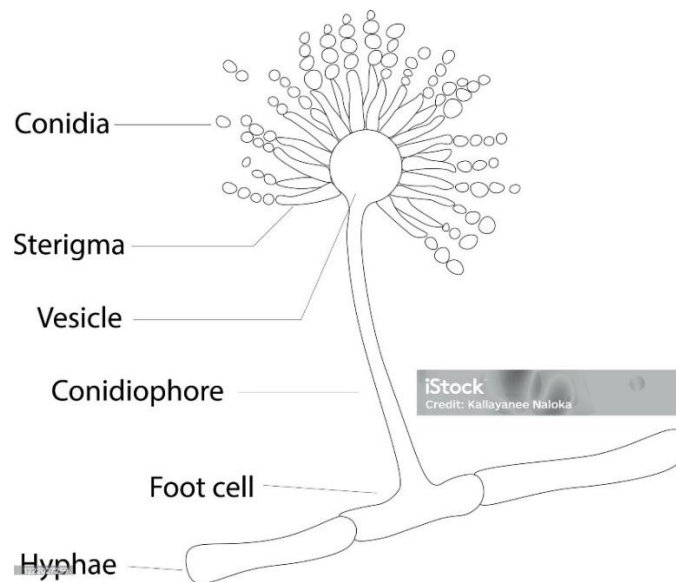
- 1) Diambil kaca objek sebanyak 2 buah.
- 2) Koloni jamur dari media SDA dan media kacang merah, sama-sama diambil 1 ose dan di letakkan di masing-masing kaca objek.
- 3) Dilakukan penetesan LPCB untuk pewarnaan pada koloni yang telah disiapkan, kemudian ditutup dengan kaca penutup dan pastikan tidak ada gelembung udara.

- 4) Kemudian morfologi *Aspergillus niger* diamati dibawah mikroskop dengan melihat konidia, vesikel serta konidiofora jamurnya, mulai dari perbesaran rendah (100x) hingga perbesaran tinggi (400x) (Ramadhani S & Wahyuni, 2020)



Sumber: Opperman, 2020

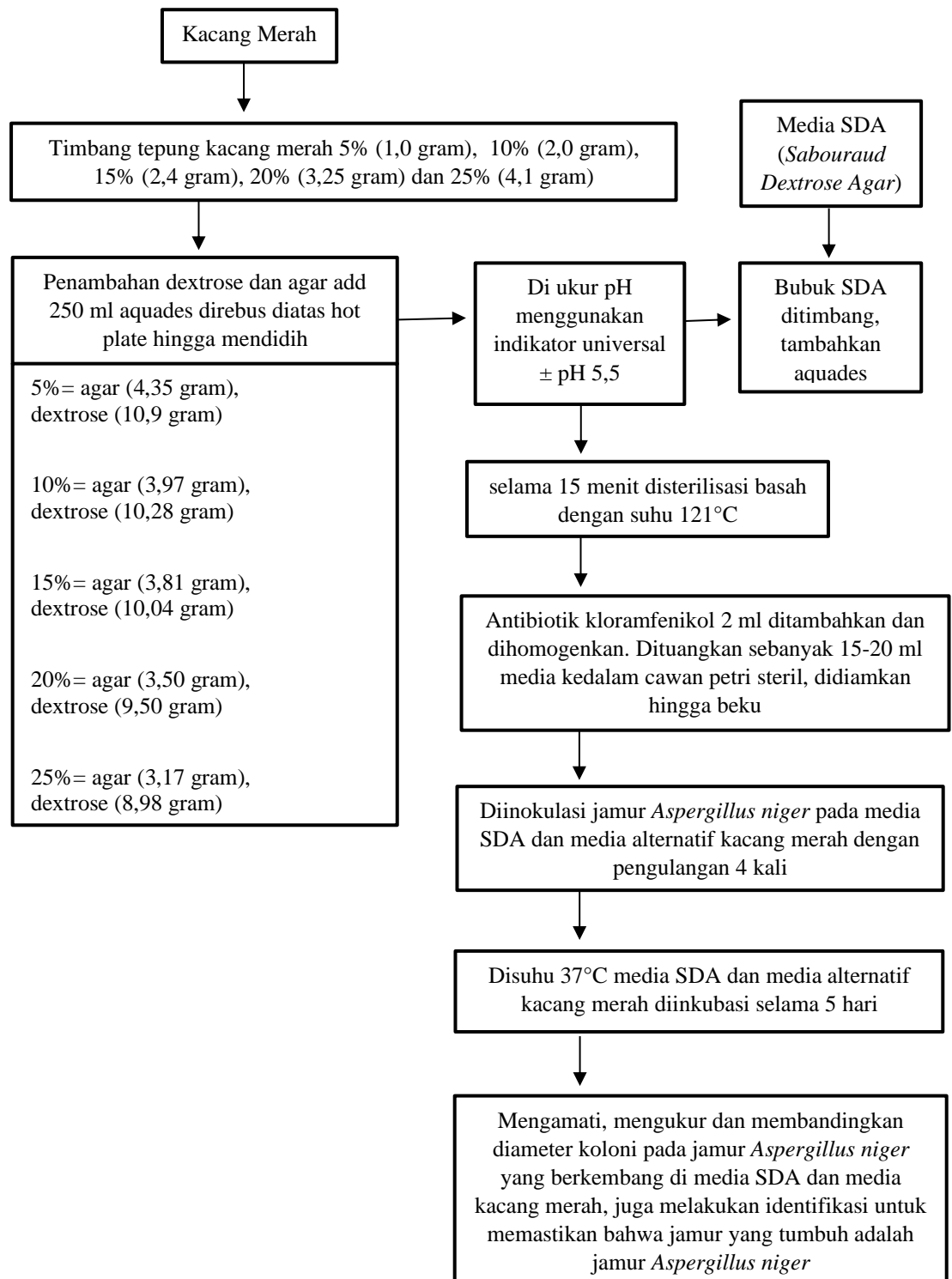
Gambar 3.1 *Aspergillus niger* pada Mikroskop dengan LPCB



Sumber: Naloka, 2020

Gambar 3.2 Struktur *Aspergillus niger* pada Mikroskop

6. Skema kerja



F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Dikumpulkan melalui metode berikut.

- a. Dalam satuan milimeter (mm) diameter koloni diukur..
- b. Dalam waktu 5 hari dilakukan pengukuran diameter dari koloni pertumbuhan dengan menandai dua diagonal tegak lurus satu sama lain dengan titik awal pengukuran ditentukan dari lokasi tusukan awal jamur.
- c. Koloni yang tumbuh pada plate di ukur memakai jangka sorong
- d. Pada pengulangan 1-4 diameter koloni per-cawan petri dihitung rata-ratanya.

2. Analisis Data

Analisis univariat & bivariat adalah metode analisis yang digunakan.

- a. Analisis univariat dilakukan terhadap data pada diameter koloni *Aspergillus niger* yang tumbuh pada media dengan berbagai konsentrasi kacang merah (5%, 10%, 15%, 20%, 25%) serta SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) menggunakan pengulangan 4 kali yang diakumulasikan serta dihitung rata-ratanya.
- b. Analisis data bivariat dilakukan dengan menguji rata-rata diameter koloni yang dianalisis menggunakan uji *One-Way Anova*. Jika ditemukan ada perbedaan rata-rata yang signifikan pada diameter koloni, maka analisis dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada tingkat kesalahan 5% atau tingkat kepercayaan 95%

G. Ethical Clearance

Penelitian ini sudah mendapatkan izin dan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Tanjungkarang yang disetujui pada tanggal 27 Maret 2025 dengan nomor surat No.082/KEPK-TJK/III/2025. Limbah yang dihasilkan tidak akan membahayakan bagi lingkungan, selama proses penelitian limbah dikumpulkan serta dikelola sesuai dengan prosedur penanganan limbah yang benar. Pembuatan media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dan kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) menghasilkan limbah cair serta sisa air perebusan media yang segera dialirkan untuk dibuang ke saluran pembuangan, dikarenakan limbah cair tersebut tidak berpotensi merusak dan mencemari untuk lingkungan. Perebusan selama 30 menit pada suhu 100°C dilakukan untuk memusnahkan limbah dari media kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*), media plate SDA serta limbah suspensi jamur *Aspergillus niger* setelah dilakukan observasi selama 5 hari, dimana air hasil perebusan ini dibuang ke saluran pembuangan, selanjutnya setelah penelitian selesai, peralatan yang dipakai dibersihkan pada air mengalir dengan memakai detergen.