

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen dengan rancangan penelitian yaitu *Statistic Grup Comparison*, peneliti melakukan kegiatan pengumpulan data berdasarkan hasil pengamatan, kepustakaan, dan dokumentasi dari setiap proses penelitian yang dilakukan. Terdapat dua variabel yaitu variabel bebas berupa media kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*) dengan konsentrasi 9%, 12%, 15%, 18%, 21% dan variabel terikat berupa pertumbuhan jamur *Aspergillus fumigatus*. Sebagai kontrol adalah media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*). Pemeriksaan menggunakan metode kerja *single dot* dengan melihat diameter koloni pada media. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali yang didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Tanjungkarang pada bulan Mei - Juni 2021.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah media pertumbuhan jamur. Media yang digunakan yaitu media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dan media dari kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*).

Media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah media SDA (*Sabauroud Dextrose Agar*) instan MERCK dengan nomor katalog 1.05438.0500. Sedangkan media alternatif yang digunakan adalah media yang berasal dari kacang merah. Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*) yang dipilih adalah kacang dengan kualitas yang baik, biji utuh, tidak tengik, dan tidak berulat (Nuryati, 2015). Kacang merah dijadikan tepung lalu dibuat media dengan konsentrasi 9%, 12%, 15%, 18%, 21% Jamur *Aspergillus fumigatus* didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran di Universitas Indonesia.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel Bebas					
	a. Media SDA	Media selektif yang digunakan untuk mengembangbiakkan jamur. Dan mendukung pertumbuhan karena tingkat keasamannya yang rendah (pH 4,5 – 5,6), dengan komposisi SDA yaitu, pepton, dextrose dan agar (Cappuccino,2014).	Observasi	Ceklist	1. Tumbuh 2. Tidak tumbuh	Nominal
	b. Media dari kacang merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>)	Media yang digunakan sebagai media alternatif untuk mengembangbiakkan dan menumbuhkan jamur. Komposisi media ini terdiri dari kacang merah, dextrose dan agar, dengan konsentrasi 9%, 12 % , 15%, 18%, 21%	Observasi	Neraca timbangan	1. Tumbuh 2. Tidak tumbuh	Nominal
2	Variabel terikat : Pertumbuhan <i>Aspergillus fumigatus</i>	Jamur <i>Aspergillus fumigatus</i> yang tumbuh di media kacang merah dengan konsentrasi 9%, 12 % , 15%, 18%, 21% menghasilkan jamur yang bludru, berwarna hijau tua atau hijau gelap dengan pinggiran putih (Hayani dkk, 2017).	Diukur diameter pertumbuhan koloni <i>Aspergillus fumigatus</i>	Jangka Sorong	Diameter koloni <i>Aspergillus fumigatus</i> : mm	Ratio

E. Pengumpulan Data

1. Pendahuluan

- a. Pembuatan surat izin penelitian dan pemesanan strain jamur *Aspergillus fumigatus* ke Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran di Universitas Indonesia.
- b. Melakukan persiapan peralatan dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian.
- c. Menentukan jumlah sampel penelitian menggunakan rumus Federer (1963) dalam (Irmawartini dan Nurhaedah, 2017).

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

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 fumigatus*

1. Strain jamur *Aspergillus fumigatus* diinokulasi pada media SDA secara aseptik dengan cara metode single dot kemudian inkubasi di inkubator selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C.
2. Diambil 1 ose koloni dari media SDA.
3. Dilakukan pewarnaan dengan meneteskan LPCB (*Lactophenol Cotton Blue*) pada koloni yang telah disiapkan kemudian ditutup dengan kaca penutup (hindari jangan sampai ada gelembung udara).
4. Kemudian diamati morfologi *Aspergillus fumigatus* dibawah mikroskop dimulai dari perbesaran rendah 100x sampai perbesaran kuat 400x.

2. Prosedur Pemeriksaan

1) Alat

Autoklaf, Alumunium foil, Batang pengaduk, Cawan petri, Corong gelas, Erlenmeyer 250 ml, Gelas kimia 250 ml, Gelas ukur 100 ml, pipet ukur,

Blender, Hot plate, Indikator universal, Inkubator, Jangka sorong, Kaca Objek, Kaca penutup, Kain kasa, Kapas, Kertas kopi, Lakban, Lampu spiritus, Mikroskop, Neraca elektrik, Oven, Ose jarum, Ose loop, Spidol, dan, label.

2) Bahan

Strain *Aspergillus fumigatus*, Media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*), Tepung Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*), dextrose, agar batang, Antibiotik Chloramphenicol 500 mg, LPCB (*Lactophenol Cotton Blue*), aquades

3. Metode Kerja

Metode single dot.

4. Prinsip Pemeriksaan

Ditanam jamur menggunakan ose jarum dan ditusukkan pada bagian tengah permukaan agar.

5. Cara Kerja

a. Sterilisasi alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian ini dibersihkan terlebih dahulu hingga bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas kopi, lalu disterilisasikan dalam oven pada suhu 160°C selama 60 menit (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan larutan kloramfenikol

Setiap 1000 ml SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) memerlukan 400 mg kloramfenikol, setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85%.

Maka untuk 400 mg diperlukan NaCl 0,85% sebanyak $\frac{400\text{mg}}{250\text{mg}} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$ (Soemarno, 2000).

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

1. Disiapkan 1 buah gelas ukur 250 ml dan 1 buah Erlenmeyer 250 mL
2. Dicuci kacang merah sebanyak 1,5 kg, lalu dikeringkan diatas sinar matahari sampai benar-benar kering.
3. Kemudian kacang merah digiling sampai halus menggunakan blender, lalu diayak.

4. Kacang merah yang telah diayak ditimbang sebanyak konsentrasi 9% (1,5 gram), konsentrasi 12% (1,96 gram), konsentrasi 15% (2,44 gram), konsentrasi 18% (2,92 gram) dan konsentrasi 21% (3,41 gram), masing-masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml.
 5. Kemudian masing-masing ditambahkan agar-agar dan dextrose sebanyak konsentrasi 9% (agar (4,16 gram), dextrose (10,59gram)), konsentrasi 12% (agar (3,99 gram), dextrose (10,3gram)), konsentrasi 15% (agar (3,8 gram), dextrose (10,01 gram)), konsentrasi 18% (agar (3,62 gram), dextrose (9,71 gram)) dan konsentrasi 21% (agar (3,44 gram), dextrose (9,4 gram)).
 6. Ditambahkan aquades sebanyak 250 ml, lalu direbus di atas hot plate hingga mendidih.
 7. Kemudian diukur pH nya menggunakan indikator universal, bila pH terlalu basa dapat ditambahkan HCl 0,01 N beberapa tetes dan bila pH terlalu asam dapat ditambahkan NaOH 0,01 N beberapa tetes, lalu diukur kembali pH hingga $\text{pH} \pm 5,5$.
 8. Dipanaskan kembali hingga homogen, lalu diangkat dan Erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas yang telah dibungkus aluminium foil.
 9. Media sterilisasi basah dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
 10. Didiamkan hingga suhu turun lalu ditambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 2 ml, kemudian dihomogenkan.
 11. Media kacang merah dituangkan ke dalam cawan petri steril masing-masing 15 –20 ml secara aseptis, didiamkan hingga beku.
- d. Pembuatan media SDA
1. Ditimbang sebanyak 16,25 gram bubuk media SDA masukkan ke dalam erlenmeyer
 2. Kemudian ditambahkan 250 ml aquades.
 3. Medium dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna selama 1 menit.
 4. Disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C , tekanan 1 – 2 atm.

5. Larutan didiamkan hingga suhu turun, lalu ditambahkan antibiotik chloramphenicol 2 ml, kemudian dihomogenkan.

6. Dituangkan 10–20 ml media SDA ke dalam cawan petri steril secara aseptis dan homogenkan

(Sumber : Safitri dan Novel, 2010)

e. Uji penelitian

1. Jamur *Aspergillus fumigatus* diinokulasi pada modifikasi media kacang merah dan media SDA secara aseptik dengan cara metode single dot kemudian inkubasi di inkubator pada suhu 37°C.

2. Besarnya diameter koloni jamur *Aspergillus fumigatus* pada media SDA dan modifikasi media kacang merah dengan konsentrasi 9%, 12% , 15%, 18%, 21%, diukur menggunakan jangka sorong setiap 24 jam selama 5 hari

f. Uji penegasan

1. Disiapkan 2 kaca objek.

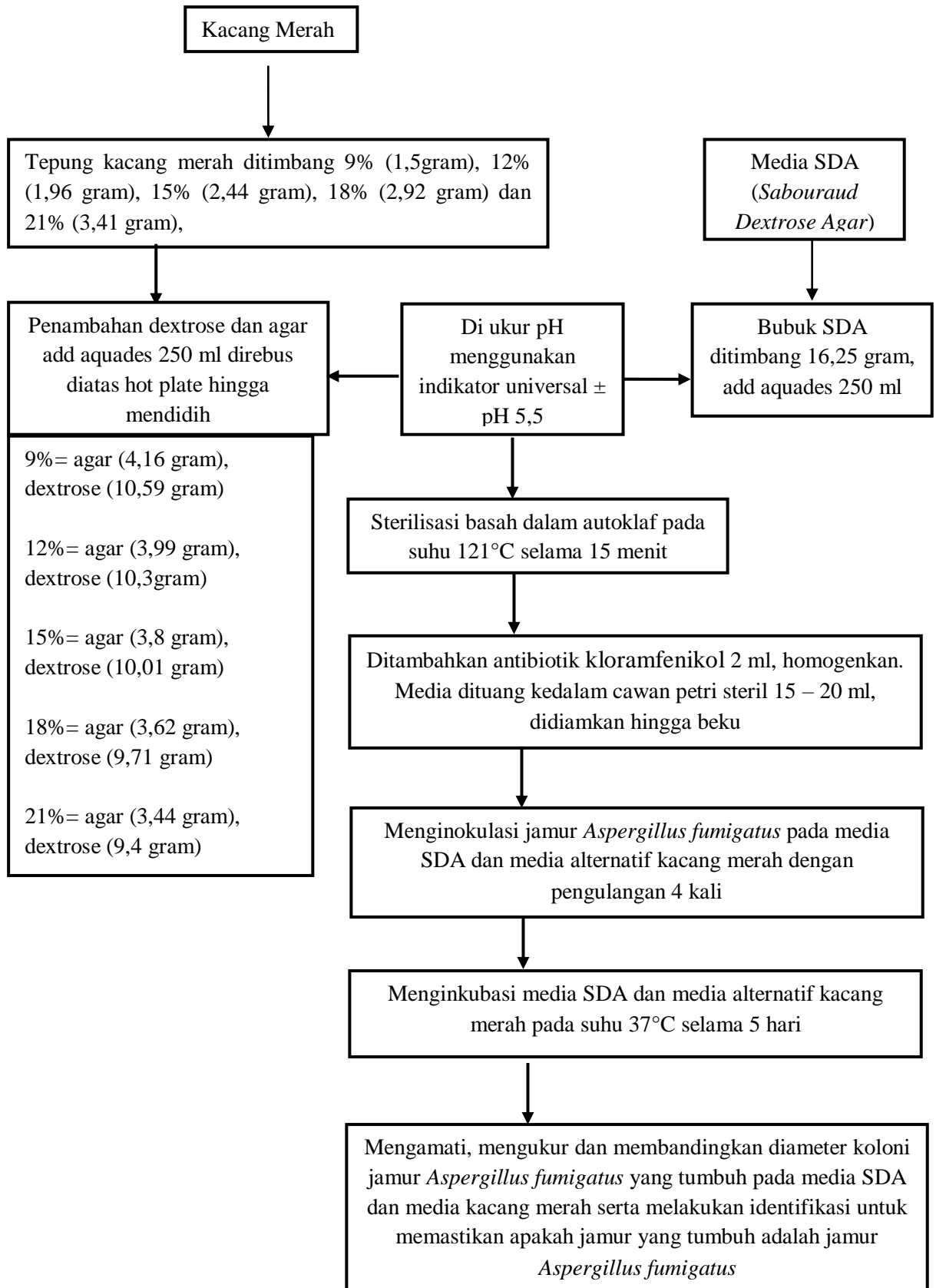
2. Diambil 1 ose koloni dari media kacang merah dan 1 ose koloni dari media SDA.

3. Dilakukan pewarnaan dengan meneteskan LPCB pada koloni yang telah disiapkan kemudian ditutup dengan kaca penutup (hindari jangan sampai ada gelembung udara).

4. Kemudian diamati morfologi *Aspergillus fumigatus* dibawah mikroskop dimulai dari perbesaran rendah 100x sampai perbesaran kuat 400x.

(Sumber : Tim Bakteriologi Balai Veteran Lampung, 2014)

6. Skema kerja



F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara:

- a. Diameter koloni dihitung dalam satuan mm.
- b. Diameter koloni ditentukan selama lima hari dari pertumbuhan dengan menandai dua diagonal tegak lurus satu sama lain dengan titik awal pengukuran adalah titik dimana tusukan jamur ditempatkan.
- c. Diukur diameter jamur yang tumbuh di cawan petri masing-masing dengan menggunakan jangka sorong.
- d. Dihitung rata-rata diameter koloni per cawan petri pada pengulangan 1-5.

2. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis data univariat dan bivariat.

- a. Analisis data univariat data yang berupa diameter koloni pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* terhadap variasi konsentrasi kacang merah 9%, 12% , 15%, 18%, 21% dan SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dengan pengulangan sebanyak 4 kali kemudian diakumulasikan dan dihitung rata-ratanya.
- b. Analisis data bivariat data yang berupa hasil rata rata diameter koloni yang di analisis dengan uji *One Way Anova*. Apabila ada perbedaan yang signifikan rata rata diameter koloni, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf kesalahan 5% atau tingkat kepercayaan 95%

G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik, sehingga perlu dilakukan proses telaah secara etik dan menyerahkan naskah skripsi ke Komite Etik Poltekkes Tanjungkarang untuk dinilai kelayakannya.

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 SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dan kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) maupun sisa dari air perebusan pembuatan media tersebut ditangani dengan cara langsung di buang pada saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan tidak membahayakan lingkungan. Limbah media plate SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dan media kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) setelah

dilakukan pengamatan selama 5 hari serta limbah suspensi jamur *Aspergillus fumigatus* pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan limbah media plate dan suspensi jamur *Aspergillus fumigatus* dibuang pada saluran pembuangan, lalu plate dan tabung sehabis penelitian dicuci menggunakan detergen pada air mengalir