

## BAB II METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan tempat penelitian

Sampel makroalga *Eucheuma cattonii* didapat dari budidaya selama 45 hari di Pulau Pari, Kepulauan Seribu, Provinsi DKI Jakarta. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, Universitas Nasional, Jakarta Selatan. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juni - Agustus 2023.

### B. Instrumen penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: baskom/ember, pisau, oven, kompor listrik, panci, *beaker glass*, blender, saringan, kertas saring, corong, labu erlenmeyer, cetakan, kain blacu, cawan Petri, *plastic wrap*, gelas ukur, pipet (volume dan gondok), *autoclave*, inkubator, timbangan analitik, batang pengaduk, jarum ose, bunsen, kertas pembungkus, pH meter, *Laminar Air Flow* (LAF), mikroskop, lemari pendingin, kamera dan alat tulis (Gambar Lampiran 1).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: makroalga *Eucheuma cattonii*, akuades, media kontrol (PDA komersial), kaporit 0,25% atau CuO 5%, KOH, kloramfenikol dan biakan jamur *Aspergillus niger* (Gambar Lampiran 1).

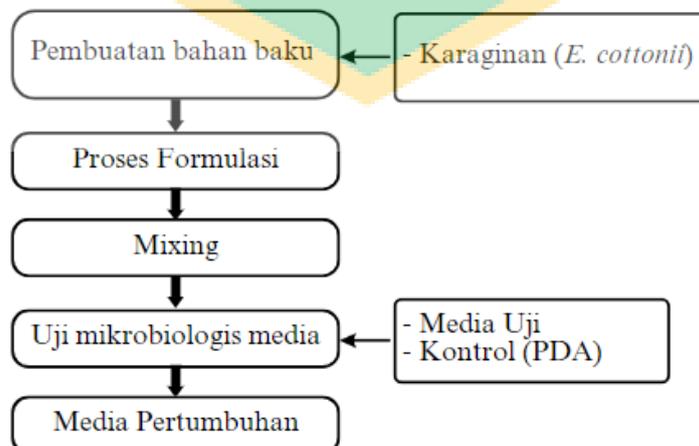
Variabel yang digunakan dalam penelitian meliputi variabel independen (bebas) yaitu formulasi media serta variabel dependen (terikat) yaitu pertumbuhan jamur *A. niger*. Definisi Operasional Variabel (DOV) dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Definisi Operasional Variabel**

No	Variabel	DOV	Sumber	Satuan
1	Formulasi media	Formulasi media terdiri dari ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i> (karagenan), ekstrak kentang dan dekstrosa. Konsentrasi karagenan antara lain 100 g/L, 75 g/L, 50 g/L, 25 g/L dan PDA sebagai pembanding	-	-
2	Pertumbuhan jamur ( <i>A. niger</i> )	Deskripsi pertumbuhan koloni mikroba pada media (diameter koloni, tekstur, permukaan dan kecepatan pertumbuhan)	Pengamatan langsung	mm

### C. Cara kerja

Penelitian ini dilakukan dengan membuat bahan dasar berupa karagenan dari *Eucheuma cottonii* kemudian dilakukan pembuatan media pertumbuhan jamur dan pengujian produk yang dihasilkan, dibandingkan dengan produk PDA komersial. Cara kerja penelitian ini dirancang dengan skema alur penelitian yang dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1. Skema penelitian**

## 1. Sterilisasi alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian (*beaker glass*, labu erlenmeyer, cawan Petri, pipet volume) disterilisasi dengan cara dibungkus menggunakan kertas koran, kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 180° C selama 2 jam atau *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit (Hakim, 2018).

## 2. Pembuatan Karagenan

### a) Pencucian dan sortasi

Pencucian rumput laut dilakukan menggunakan air tawar sampai bersih. Kotoran yang menempel seperti pasir, karang, lumpur dan rumput laut jenis lain dipisahkan atau dihilangkan kemudian dikeringkan dengan sinar matahari  $\pm$  4 hari (hingga kadar air sampel < 15%) (Hartanto dan Ariningsih, 2018; Kumala *et al.*, 2013).

### b) Perendaman dan pemucatan

Perendaman dilakukan agar rumput laut menjadi lunak, sehingga proses ekstraksi nantinya dapat berjalan dengan baik. Caranya makroalga direndam dalam air tawar sebanyak 20 kali berat makroalga selama 3 hari dengan mengganti air rendaman setiap harinya. Setelah itu pemucatan dilakukan dengan direndam dalam larutan kaporit 0,25% sambil diaduk, setelah 4-6 jam, makroalga dicuci kembali selama 3 jam untuk penetralan dan menghilangkan bau kaporit atau kapur. Makroalga yang telah bersih dan pucat dikeringkan selama 2 hari dengan sinar matahari (Hartanto dan Ariningsih, 2018).

### c) Pencucian

Pencucian dilakukan untuk memastikan makroalga bersih dan terbebas dari berbagai kotoran dengan cara dibilas menggunakan air tawar.

### d) Ekstraksi

Ekstraksi makroalga dilakukan berupa perebusan makroalga dengan penambahan akuades sebanyak 40 kali berat kering sampel yang dilakukan selama 1-2 jam pada suhu 90-100°C. Setelah mendidih, dilakukan penyaringan, akan diperoleh

filtrat dan ampas, filtrat ditampung dalam wadah, dan ampasnya dipanaskan kembali, disaring dan filtratnya dicampur dengan filtrat pertama (Hartanto dan Ariningsih, 2018).

Filtrat yang diperoleh, selanjutnya direbus dan ditambahkan 3% KOH dari berat makroalga awal dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 30 menit sambil terus diaduk, setelah mendidih, diangkat, dicetak didinginkan dan dibiarkan 1 malam agar menjendal (mengental), selanjutnya dipotong-potong. Penambahan KOH (larutan alkali) berfungsi dalam membantu ekstraksi polisakarida menjadi lebih sempurna dan meningkatkan mutu karagenin dengan mempercepat eliminasi 6-sulfat dari unit monomer menjadi 3,6-anhidro-D-galaktosa (Ega *et al.*, 2016). Tiap lembar karagenan dibungkus dengan kain blacu dan disusun dalam kotak yang kemudian dilakukan pengepresan dengan memberi pemberat pada bagian atasnya dan dibiarkan selama satu malam. Pengepresan bertujuan untuk mengeluarkan air dari karagenan sehingga diperoleh lembaran karagenan yang tipis. Kemudian lembaran karagenan yang didapat dikeringkan dengan sinar matahari, hingga diperoleh karagenan kertas (Kumala *et al.*, 2013; Sudariastuty, 2011).

**e) Penepungan**

Karagenan kertas yang diperoleh setelah pengepresan dan pengeringan matahari, diserbukkan menggunakan blender, kemudian disaring dengan saringan 100 mesh hingga diperoleh karagenan tepung.

**3. Pembuatan media pertumbuhan mikroba**

**1. Media kontrol PDA (*Potato Dektrose Agar*)**

Serbuk *Potato Dektrose Agar* sebanyak 3,9 g dan dilarutkan dalam 100 mL akuades. Kemudian dipanaskan sampai mendidih. Larutan media yang telah mendidih, disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama kurang lebih 15 menit. Media yang sudah steril dituang ke cawan Petri steril sebanyak 15-20 mL secara aseptik. Pengerjaan tersebut dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF).

## 2. Formulasi media makroalga

Penelitian yang dilakukan oleh Hartanto dan Ariningsih (2018) tentang pembuatan media uji mikrobiologi siap pakai dari bahan baku lokal Indonesia yaitu *Gracilaria* sp untuk pengujian parameter angka lempeng total menggunakan *E. coli* menyebutkan bahwa formulasi terbaik terdiri atas agar 51,4%, glukosa 5,7%, yeast ekstrak 14,4% dan tripton 28,5%. Berdasarkan penelitian tersebut, alga merah dapat digunakan sebagai media pertumbuhan dengan formulasi penambahan bahan tertentu. Oleh karena itu, pada penelitian ini, dilakukan percobaan menggunakan jenis makroalga berbeda yaitu *E. cottonii* dengan penambahan ekstrak kentang dan dekstrosa yang diuji menggunakan jamur *A. niger*. Penambahan ekstrak kentang dan dekstrosa beracuan pada media komersial yaitu PDA (Ekstrak kentang 4 g/L, dekstrosa 20 g/L dan agar 15 g/L) namun dengan penambahan yang lebih rendah dari pada komposisi PDA komersial. Berikut komposisi media makroalga pada penelitian ini:

- 1) Formula 1 : karagenan 100 g/L
- 2) Formula 2 : karagenan 75 g/L, ekstrak kentang 1 g/L dan dekstrosa 5 g/L
- 3) Formula 3 : karagenan 50 g/L, ekstrak kentang 2 g/L dan dekstrosa 10 g/L
- 4) Formula 4 : karagenan 25 g/L, ekstrak kentang 3 g/L dan dekstrosa 15 g/L
- 5) Kontrol (PDA) : Agar 15 g/L, ekstrak kentang 4 g/L dan dekstrosa 20 g/L

Kemudian masing-masing campuran formula tersebut ditambahkan kloramfenikol 0,315 g/L lalu dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah itu dituangkan ke dalam cawan Petri steril sebanyak 15-20 mL secara aseptik.

## 4. Inokulasi mikroba pada media (Uji Mikrobiologi)

Biakan *A. niger* diinokulasikan pada media uji dan kontrol (PDA) dengan metode tusuk secara aseptik di LAF, kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar (37°C) (Hadioetomo, 1985; Imas, 2009; Ingrid dan Suharto, 2012). Pada umumnya lama waktu inkubasi jamur multiseluler adalah 5 – 7 hari (Pelczar dan Chan, 2008).

## 5. Pengamatan *A. niger*

Biakan *A. niger* didapat dari Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika diamati karakteristik morfologinya melalui pengamatan langsung setiap interval 24 jam selama 7 hari meliputi bentuk, warna, permukaan koloni, sporulasi (kelebatan) dan struktur miselium (ketebalan dan warna). Diameter koloni diukur menggunakan jangka sorong. Kemudian dihitung laju pertumbuhan miselium menggunakan persamaan berikut (Lilly dan Barnett, 1951):

$$\text{Laju Pertumbuhan} = \frac{\text{Diameter akhir} - \text{Diameter awal}}{\text{Rentang jumlah hari}}$$

Adapun pengamatan mikroskopis dilakukan dengan cara diambil biakan koloni *A. niger* sebanyak 1 ose, kemudian disebar-ratakan di atas kaca objek yang telah ditetesi pewarnaan *Lactophenol cotton blue* (LPCB) kemudian diamati di bawah mikroskop menggunakan perbesaran 400X.

### D. Analisis data

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan sistem Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan taraf perakuan media makroalga yaitu formula 1, formula 2, formula 3, formula 4 dan media kontrol (PDA) yang diujikan pada jamur *A. niger* dengan ulangan sebanyak 5 kali. Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *one way anova* dengan program SPSS. Apabila hasil uji *one way anova* menunjukkan perbedaan yang signifikan, maka dilakukan uji lanjut BNJ 5% (Tukey-HSD) untuk melihat perbedaan nyata jujur antar taraf perlakuan dengan kontrol.