

**PERBANDINGAN EFEK PRESERVASI GLISEROL 10% PADA SUHU 4°C**

**TERHADAP VIABILITAS *Aspergillus niger* PADA HARI KE-LIMA DAN  
HARI KE-SEPULUH SELAMA PERIODE 1 TAHUN SECARA *IN VITRO***

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**ANDI RAHMANIA AISHA**

**NIM: 165070100111070**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**DAFTAR ISI**



Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	x
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Lampiran.....	xii
Daftar Singkatan.....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Keilmuan.....	5
1.4.2 Manfaat Aplikatif.....	6
1.4.3 Manfaat Akademik.....	6
1.4.4 Manfaat Praktis.....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Aspergillus niger</i> .....	7
2.1.1 Taksonomi.....	7
2.1.2 Morfologi dan Identifikasi.....	8
2.1.3 Mikotoksin dan Faktor Virulensi.....	10
2.1.4 Temuan Klinis.....	10
2.1.5 Pengobatan Otomikosis.....	11
2.1.6 <i>Aspergillosis</i> pada Pasien <i>Immunocompromised</i> .....	12
2.1.7 Epidemiologi dan Pengendalian.....	14
2.2 Teknik Preservasi Jamur.....	14
2.2.1 Definisi.....	14
2.2.2 Preservasi dengan <i>Mineral Oil</i> .....	16
2.2.3 Preservasi dengan <i>Serial Transfer</i> .....	16
2.2.4 Preservasi dengan <i>Distilled Water Stasis</i> .....	17
2.2.5 Preservasi dengan <i>Silica Gel</i> .....	17
2.2.6 Preservasi pada Suhu Ruang.....	18
2.2.7 Preservasi dengan Tanah.....	19
2.2.8 Penelitian Preservasi <i>Aspergillus</i> dengan Gliserol pada 4°C.....	19

2.2.9	Preservasi dengan <i>Cryoprotectant</i> .....	20
2.3	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> sebagai Media Pertumbuhan <i>Aspergillus</i> .....	21
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....		23
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	23
3.1.1	Penjelasan Kerangka Konsep.....	24
3.2	Hipotesis Penelitian .....	24
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b> .....		25
4.1	Rancangan Penelitian .....	25
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian .....	25
4.3	Variabel Penelitian .....	25
4.3.1	Variabel Bebas.....	25
4.3.2	Variabel Terikat.....	25
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	26
4.5	Definisi Operasional.....	26
4.6	Alat dan Bahan Penelitian.....	27
4.6.1	Alat.....	27
4.6.2	Bahan.....	28
4.7	Prosedur Penelitian.....	28
4.7.1	Tahap 1. Penghitungan Gliserol dan Preservasi.....	28
4.7.2	Tahap 2. <i>Revival</i> dan Pengukuran.....	30
4.7.3	Tahap 3. Penjelasan Cara Penelitian.....	31
4.8	Analisis Data.....	33
4.8.1	Pendekatan Waktu Lama Simpan.....	33
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA</b> .....		35
5.1	Hasil Penelitian .....	35
5.1.1	Hasil Rerata Diameter Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> .....	35
5.2	Analisis Data.....	42
5.2.1	Uji Normalitas dan Homogenitas Data.....	42
5.2.2	Uji <i>Mann Whitney U Test</i> .....	43
5.2.3	Uji <i>Post Hoc Tukey Test</i> Hari ke-5 setelah <i>Revival</i> .....	44
5.2.4	Uji <i>Post Hoc Tukey Test</i> Hari ke-10 setelah <i>Revival</i> .....	45
5.3	Identifikasi <i>Aspergillus niger</i> dengan LPCB .....	47
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....		48
<b>BAB 7 PENUTUP</b> .....		54
7.1	Kesimpulan .....	54
7.2	Saran .....	54
	Daftar Pustaka.....	55
	Lampiran.....	59



## ABSTRAK

Aisha, Andi Rahmania. 2019. **Perbandingan Efek Preservasi Gliserol 10% Pada Suhu 4°C Terhadap Viabilitas *Aspergillus niger* Pada Hari Ke-Lima dan Hari Ke-Sepuluh Selama Periode 1 Tahun Secara *In Vitro*.**

Tugas Akhir. Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Dewi Erikawati, MSi (2) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes

*Aspergillus niger* merupakan jamur berfilamen dengan ciri khas konidia yang berwarna hitam. *Aspergillus niger* dapat menyebabkan beberapa penyakit seperti otomikosis dan *invasive aspergillosis*. Meskipun jamur dapat menyebabkan infeksi pada manusia, jamur juga dapat memberikan manfaat sebagai bahan pengolahan pangan, obat, ataupun bahan penelitian, sehingga dibutuhkan teknik preservasi jamur untuk menjaga karakteristik jamur selama waktu penyimpanan yang panjang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek preservasi *Aspergillus niger* dengan menggunakan gliserol 10% pada suhu 4°C selama periode 1 tahun secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode *experimental post-test only with control group design* dengan cara mengukur rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival* di *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) selama 7 kali *revival* dalam periode 1 tahun. Hasil penelitian ini dengan menggunakan uji statistik *Mann Whitney U Test* menunjukkan korelasi yang tidak signifikan ( $p=0.053$ ). Kesimpulan dari penelitian ini adalah tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* yang diukur pada hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival* selama periode 1 tahun. Hasil dari Uji *Post Hoc Tukey Test* menunjukkan bahwa seiring dengan lamanya waktu penyimpanan isolat *Aspergillus niger*, rerata diameter pertumbuhannya semakin menurun.

**Kata kunci:** *Aspergillus niger*, *revival*, preservasi jamur, gliserol 10%, suhu 4°C, *in vitro*

## ABSTRACT

Aisha, Andi Rahmania. 2019. **The Comparison Effect of Glycerol 10% Preservation in 4°C on The Viability of *Aspergillus niger* on the 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day after Revival Within a One Year Period *In Vitro***. Final Assigment. Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dewi Erikawati, MSi (2) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes

*Aspergillus niger* is a filamentous fungi that has a black conidia as its specific characteristic. *Aspergillus niger* can cause many diseases in humans such as otomycosis and invasive aspergillosis. Even though there are many infections that can be caused by fungi, they also have their own benefits as food processing ingredients, medicine or as an experimental material. Therefore, fungi preservations are needed to keep their characteristics intact while undergoing a long time of preservation. The aim of this study was to determine the effect of *Aspergillus niger* preservation using a glycerol 10% in a 4°C temperature during a one year period in vitro. This study used an experimental post-test only with control group design method. The average diameter of *Aspergillus niger*'s growth was measured on the 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day after *revival* on a Sabouraud Dextrose Agar (SDA) with a total of 7 times *revival* during a one year period. The result of this study using a statistical Mann Whitney U Test showed a non significant correlation ( $p=0.053$ ). The conclusion of this study is that there is no significant difference in the average diameter growth of *Aspergillus niger* between the data that was measured on the 5<sup>th</sup> and on the 10<sup>th</sup> day after *revival* during a one year period of experiment. The results using statistical Post Hoc Tukey Test showed that during the one year experimental period, the *Aspergillus niger* sample underwent a decrease in its average diameter growth.

Keywords: *Aspergillus niger*, *revival*, fungi preservation, glycerol 10%, 4°C temperature, *in vitro*

## BAB 1

## PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

Infeksi termasuk salah satu penyebab besarnya angka kematian dan kecacatan di dunia. Infeksi dapat disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, virus, parasit atau jamur. Infeksi jamur (mikosis) sendiri digolongkan menjadi superfisialis, kutan, subkutan, sistemik dan oportunistik mikosis. Sebuah studi yang dilakukan oleh *Science Traditional Medicine* menunjukkan bahwa mikosis superfisialis adalah infeksi jamur terbanyak yang menyerang 1,7 miliar ( $\pm$  25%) penduduk di dunia, dan oportunistik mikosis memiliki tingkat kematian yang tinggi dengan prevalensi  $\pm$ 1,000,000 kasus *Cryptococcosis*,  $\pm$ 400,000 kasus *Pneumocystis* dan  $\pm$ 200,000 kasus *Aspergillosis* di dunia (Brown *et al.*, 2012).

Patogen utama penyebab infeksi jamur yang sangat serius dan fatal adalah *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis jirovecii* dan *Histoplasma capsulatum* (Bongomin *et al.*, 2017).

Mikosis oportunistik terjadi saat patogen menyerang hospes dengan gangguan atau kelemahan sistem kekebalan tubuh (*immunocompromised host*), seperti pada pasien kanker, penerima transplantasi organ dan penderita AIDS.

Salah satu penyebab mikosis oportunistik adalah spesies *Aspergillus*. Spesies *Aspergillus* menyebabkan sindroma utama berupa *Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis* (ABPA), *Chronic Pulmonary Aspergillosis* (CPA), *Aspergilloma*, serta *Invasive Aspergillosis* (IA) (Harman, 2019).

Sebuah studi menunjukkan bahwa ABPA menyerang 1-15% pasien *Cystic Fibrosis* dan 2,5% pasien asma. 400.000 orang dari 4,8 juta orang dengan

ABPA juga mengalami CPA. 1,2 juta orang terserang CPA sebagai kelanjutan dari penyakit tuberkulosis (CDC, 2017). Studi yang dilakukan oleh *Science Traditional Medicine* menunjukkan bahwa *Invasive Aspergillosis* dapat menyerang individu dengan gangguan sistem kekebalan tubuh, terutama pada orang dengan jumlah netrofil yang rendah, penerima transplantasi organ, pasien dengan terapi kortikosteroid dosis tinggi serta pada pasien *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD). Jumlah kejadian *Invasive Aspergillosis* setiap tahun adalah  $\pm 200.000$  kasus dengan 50% tingkat kematian meskipun telah tertangani, dan dapat menjadi 100% fatal apabila diagnosis nya salah ataupun terlambat (Brown *et al*, 2012). Suatu jurnal tentang prevalensi penyakit jamur menunjukkan bahwa insiden dan prevalensi *Invasive Aspergillosis* banyak terjadi di Benua Asia dengan  $\pm 9.000$  kasus, diikuti dengan  $\pm 5.000$  kasus di Benua Afrika dan Amerika Utara,  $\pm 4.000$  kasus di Benua Eropa dan  $\pm 2.000$  kasus di Benua Amerika Tengah dan Amerika Selatan (Bongomin *et al*, 2017).

Beberapa spesies dari *Aspergillus* adalah *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus felis*, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, dan *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* adalah suatu jamur berfilamen yang dapat menyebabkan infeksi pada telinga yang disebut dengan otomikosis. Prevalensi otomikosis mencapai 9% hingga 27,2% pada pasien dengan gejala otitis externa dan 30% pada pasien dengan pengeluaran sekret di telinga. Otomikosis banyak ditemukan pada wilayah lembab di negara tropis dan subtropis (Prasad *et al*, 2014).

Dalam bidang kesehatan, meskipun jamur dapat menyebabkan infeksi yang serius pada manusia, namun jamur juga dapat memberikan manfaat bagi makhluk hidup, seperti kegunaannya sebagai bahan untuk pengolahan pangan,

sebagai bahan penelitian, sebagai kontrol pestisida, dan juga sebagai obat.

Beberapa obat yang dapat diisolasi dari jamur adalah *penicillin*, *lovastatin* dan *cyclosporine* (Crampton, 2017). Maka dari itu, perlu dikembangkan suatu metode preservasi jamur untuk menjaga viabilitas, morfologi, fisiologi dan integritas gen jamur selama jangka waktu penyimpanan yang panjang (Nakasone *et al*, 2004).

Preservasi jamur juga dapat digunakan dalam menjaga persediaan jamur agar dapat digunakan sewaktu-waktu, baik dalam penggunaannya untuk dijadikan sebagai bahan eksperimental atau untuk bahan pembelajaran.

Preservasi jamur telah banyak dilakukan dengan menggunakan metode yang beragam. Salah satu prosedur preservasi jamur yang banyak dilakukan di dunia adalah *lyophilization* (*freeze-drying*). Salah satu keuntungan dari preservasi fungi dengan menggunakan *lyophilization* ini adalah jamur dapat bertahan dalam jangka waktu penyimpanan yang lama dan tidak memerlukan transfer berkala. Prosedur ini sangat efektif untuk digunakan pada *conidial fungi* (*hyphomycetes* dan *coelomycetes*), *ascomycetes* dan *basidiomycetes* (American Type Culture Collection (ATCC), 2011). Tetapi, teknik preservasi dengan menggunakan *lyophilization* ini menyebabkan spora dari beberapa jenis jamur menjadi sangat rusak. Spora ini digunakan oleh jamur sebagai alat berkembangbiak, sehingga apabila spora jamur rusak selama menjalani masa preservasi, maka jamur tidak akan dapat melakukan perkembangbiakan. Teknik preservasi *lyophilization* juga tidak efektif untuk digunakan pada jamur yang mengandung volume vakuola tinggi, seperti *oomycetes* dan *entomophthorales* (American Type Culture Collection (ATCC), 2011) Maka dari itu, *lyophilization* memiliki beberapa keterbatasan dalam penggunaannya sebagai teknik preservasi jamur.

Prosedur lain untuk preservasi jamur yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan *liquid nitrogen freezers*. Preservasi dengan menggunakan metode ini memiliki banyak keuntungan karena dapat digunakan untuk semua jenis fungi dan viabilitas jamur juga terjaga untuk jangka waktu yang panjang. Tetapi, metode ini membutuhkan biaya yang sangat mahal karena persediaan *liquid nitrogen* yang wajib ada terus menerus (American Type Culture Collection (ATCC), 2011). Maka dari itu, metode preservasi dengan *liquid nitrogen freezers* tidak banyak dilakukan karena tidak mudah dijangkau dari segi biaya oleh banyak laboratorium di dunia.

Berdasarkan penjelasan di atas, perlu dikembangkan suatu metode lain untuk melakukan teknik penyimpanan pada jamur. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek preservasi gliserol 10% pada suhu 4°C terhadap viabilitas *Aspergillus niger* yang diukur pada hari ke-lima dan hari ke-sepuluh setelah *revival* pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) selama periode 1 tahun. Gliserol 10% berfungsi sebagai *cryoprotectant* untuk mencegah kerusakan sel selama masa preservasi karena efek dari suhu 4°C dapat menurunkan kemampuan jamur untuk regenerasi. Suhu 4°C digunakan sebagai suhu penyimpanan jamur karena kulkas bersuhu 4°C mudah didapatkan dan tidak membutuhkan biaya yang cukup besar. Menurut penelitian yang ditulis oleh Kibbler *et al* pada tahun 2018, pertumbuhan *Aspergillus niger* membutuhkan waktu 2-6 hari pada media SDA sehingga penelitian ini menggunakan hari ke-5 dan hari ke-10 sebagai hari pengukuran rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* untuk melihat bagaimana pertumbuhannya diantara rentang 2-6 hari tersebut (hari ke-5) dan bagaimana pertumbuhannya setelah rentangan tersebut (hari ke-10). Viabilitas *Aspergillus niger* pada penelitian ini dilihat dengan mengukur rerata diameter

pertumbuhannya pada hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival*. Diharapkan dengan adanya penelitian ini, maka masyarakat umum dapat meningkatkan pengetahuan tentang preservasi jamur pada suhu 4°C dengan menggunakan gliserol 10% sebagai *cryoprotectant*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah preservasi jamur dengan pemberian gliserol 10% pada suhu 4°C memiliki efek terhadap viabilitas *Aspergillus niger* secara *in vitro* pada hari ke-lima dan hari ke-sepuluh setelah *revival* selama 1 tahun periode penelitian?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek preservasi gliserol 10% pada suhu 4°C terhadap viabilitas *Aspergillus niger* pada hari ke-lima dan hari ke-sepuluh setelah *revival* selama periode 1 tahun secara *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui perbandingan rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* antara hari ke-lima dan hari ke-sepuluh setelah *revival* yang ditumbuhkan pada SDA selama 1 tahun periode penelitian dengan preservasi gliserol 10% pada suhu 4°C.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Keilmuan

Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah khasanah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan tentang pengaruh preservasi gliserol 10%

pada suhu 4°C terhadap viabilitas *Aspergillus niger* secara *in vitro* pada hari ke-  
lima dan hari ke-sepuluh setelah *revival*.

#### 1.4.2 Manfaat Aplikatif

Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk memberikan informasi kepada  
kalangan perindustrian dalam bidang kesehatan tentang kegunaan preservasi  
gliserol 10% pada suhu 4°C terhadap viabilitas *Aspergillus niger* secara *in vitro*.

#### 1.4.3 Manfaat Akademik

Dapat digunakan sebagai referensi untuk penelitian lebih lanjut tentang  
preservasi menggunakan suhu dan konsentrasi gliserol yang berbeda sehingga  
dapat digunakan untuk mengetahui viabilitas *Aspergillus niger* secara *in vitro*  
selama masa preservasi.

#### 1.4.4 Manfaat Praktis

Dapat memberi informasi alternatif tentang cara mengukur viabilitas  
*Aspergillus niger* secara *in vitro*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* tersebar luas di alam dan tumbuh secara cepat. Jamur ini bersifat saprofit pada dedaunan mati, biji-bijian, tumpukan kompos dan tumbuhan mati lainnya. *Aspergillus niger* dapat ditemukan di udara luar ruangan dan udara dalam ruangan, air, makanan serta debu (Greenwood *et al*, 2007).

2.1.1 Taksonomi

Taksonomi dari *Aspergillus niger* adalah sebagai berikut:



- Kingdom : *Fungi*
- Phylum : *Ascomycota*
- Class : *Eurotiomycetes*
- Ordo : *Eurotiales*
- Family : *Trichocomaceae*
- Genus : *Aspergillus*
- Spesies : *Aspergillus niger*

**Gambar 2.1** Kultur *Aspergillus niger* pada media *Sabouraud Dextrose Agar*. Didapatkan koloni berwarna putih seperti gambaran kapas dengan khas konidia berwarna coklat tua-kehitaman. (Rijal, 2015).





Kumpulan fialid dan metula

Konidia *Aspergillus niger* berwarna hitam dan berbentuk bulat

Konidiofor *Aspergillus niger*

**Gambar 2.2** Gambaran mikroskopik *Aspergillus niger*. Didapatkan konidia berwarna hitam dan berbentuk bulat, konidiofor serta kumpulan fialid dan metula. Pengecatan menggunakan LPCB dengan pembesaran 400. (Kibbler et al, 2017).

### 2.1.2 Morfologi dan Identifikasi

#### A. Tipe Organisme

*Aspergillus niger* adalah jamur berfilamen yang memiliki ciri khas konidia berwarna hitam dengan koloni berwarna putih atau kuning. Jamur ini memiliki hifa bercabang dan bersepta dengan lebar 3-6  $\mu\text{m}$  (Rosenthal dan Pfaller, 2008).

#### B. Morfologi Mikroskopik

*Aspergillus niger* memiliki hifa yang bersepta dan berhyalin. Konidinya berwarna hitam, menyebar dan berbentuk bulat dengan diameter 3,5 - 5  $\mu\text{m}$ . Konidiofor nya panjang (400 - 3000  $\mu\text{m}$ ), berdinding halus, berhyalin, berwarna gelap pada apex dan berujung dengan globose-subglobose vesikel dengan diameter 50 - 100  $\mu\text{m}$ . Fialid nya berukuran 7,0

- 9,5 x 3,4 mm dan metulanya berukuran 15 - 25 x 4,5 - 6,0 mm (d'Halewyn dan Chevalier, 2014).

### C. Kultur

Koloni *Aspergillus niger* tumbuh dengan cepat pada semua substrat. Pada *Czapek Dox Agar*, *Aspergillus niger* memberikan hasil berupa koloni yang padat dan berwarna putih kekuningan pada dasar agar dan dilapisi dengan konidia berwarna coklat tua kehitaman. Konidia yang dimiliki oleh *Aspergillus niger* berbentuk *globose*/bulat dan berdiameter 3-5  $\mu\text{m}$  (Kidd *et al*, 2016). Pada *Potato Dextrose Agar* (PDA), koloni *Aspergillus niger* pada 25°C awalnya berwarna putih yang kemudian berganti warna menjadi hitam seiring dengan produksi konidia yang tumbuh dengan cepat. Sementara, dasar PDA ini berwarna kuning pucat (Patterson dan McGinnis, 2009).

### D. Karakteristik Pertumbuhan

*Aspergillus niger* adalah jamur mesofilik yang dapat tumbuh pada suhu sedang, yaitu suhu yang tidak terlalu tinggi dan tidak terlalu rendah. Suhu optimal pertumbuhan *Aspergillus niger* adalah 20-40°C, dan tumbuh dengan baik pada suhu 37°C. Spesies ini juga dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan dengan relatif kelembaban 90-100% (d'Halewyn dan Chevalier, 2014).

### 2.1.3 Mikotoksin dan Faktor Virulensi

*Aspergillus niger* memproduksi banyak metabolit yang dapat menjadi mikotoksin. Beberapa mikotoksin yang diproduksi oleh *Aspergillus niger* adalah *nigerazine B*, *niragillin* dan *ochratoxin A*. Mikotoksin tersebut memiliki risiko berbahaya pada kesehatan makhluk hidup. Seperti contohnya, *ochratoxin A* memiliki efek nefrotoksik, karsinogenik, teratogenik dan immunosuppressif pada manusia (d'Halewyn dan Chevalier, 2014). Metabolit lain yang diproduksi adalah *gliotoxin*, yang bekerja dengan cara menghambat fagositosis makrofag dan juga menghambat aktivasi dan proliferasi sel T (Rosenthal dan Pfaller, 2008).

Beberapa enzim seperti elastase, fosfolipase, protease dan katalase berperan sebagai faktor virulensi spesies *Aspergillus* (Rosenthal dan Pfaller, 2008). Namun, *Aspergillus niger* adalah spesies jamur dengan virulensi rendah karena membutuhkan hospes dengan imunitas yang sangat rendah (*immunosuppressed host*) untuk menimbulkan penyakit jamur invasif (d'Halewyn dan Chevalier, 2014).

### 2.1.4 Temuan Klinis

Kelainan klinis yang dapat disebabkan oleh *Aspergillus niger* adalah otomikosis. Otomikosis adalah infeksi jamur superfisial subakut atau kronis pada *meatus acusticus externus*. Infeksi jamur ini dapat terjadi pada jaringan yang telah rentan karena infeksi bakteri, trauma, penggunaan antibiotik topikal atau karena adanya akumulasi serumen di *meatus acusticus externus*. Epidemiologi otomikosis banyak pada iklim lembab dan panas di negara tropis dan subtropis.

Manifestasi klinis penyakit ini adalah telinga gatal, nyeri telinga, sekret yang encer dengan bau tidak enak dan telinga buntu. Diagnosis otomikosis juga harus

dilengkapi dengan pemeriksaan mikroskopis dan kultur serumen yang didapat dari *meatus acusticus externus*. Adanya keberadaan fungi dapat dilihat melalui penggunaan *potassium hydroxide* (KOH). Pada pemeriksaan mikroskopis akan terlihat gumpalan hifa dengan konidiofor seperti pada gambar 2.3 berikut. (Aspergillus & Aspergillosis Website, 2009).



**Gambar 2.3** Gambaran otomikosis pada pemeriksaan otoskopi telinga. Didapatkan konidiofor panjang dan spora *Aspergillus niger* berwarna hitam (Kavanagh, 2017).

### 2.1.5 Pengobatan Otomikosis

Pengeringan dan pembersihan pada *meatus acusticus externus* secara hati-hati, dengan menggunakan *suction* merupakan langkah pertama pada pengobatan otomikosis. Sedangkan, pembersihan telinga dengan menggunakan *syringe* dihindari karena dapat menyebarkan infeksi ke telinga yang lebih dalam, terutama saat membran timpani mengalami perforasi atau saat membran timpani tidak terlihat karena terdapat penumpukan serumen (Aspergillus & Aspergillosis Website, 2009).

Terapi antifungal topikal berperan sangat penting dalam pengobatan otomikosis. Beberapa obat topikal yang dapat diberikan pada pasien otomikosis adalah antara lain *amphotericin B* (3%), *flucytosine* (10%), *econazole cream*

(1%), *clotrimazole cream, powder or solution (1%), thiomersal* atau *cresyl acetate solution*. *Econazole solution (1%)* sangat efektif dalam pengobatan otomikosis yang sudah dalam jangka waktu 1-3 minggu. Sedangkan, *salicylic acid, griseofulvin* dan *ketoconazole* merupakan obat topikal antifungal yang tidak terlalu efektif dalam mengobati pasien otomikosis (*Aspergillus & Aspergillosis Website, 2009*).

Antifungal tetes dapat diberikan tiga hingga empat kali sehari selama lima sampai tujuh hari. Otomikosis dapat terjadi secara asimtomatik sehingga wajib dilakukan re-evaluasi pasien pada akhir pengobatan dan juga pembersihan telinga lanjutan. Pasien dengan infeksi jamur ini dapat mengalami resisten terhadap pemberian *clotrimazole* sehingga membutuhkan pemberian *itraconazole* secara oral (*Aspergillus & Aspergillosis Website, 2009*).

Terapi antifungal sistemik dibutuhkan apabila terapi topikal pada pasien otomikosis gagal atau pada pasien yang juga memiliki otitis externa infasif. *Itraconazole* dapat diberikan pada otitis externa superfisialis. Pada keadaan perforasi membran timpani dapat diobati dengan pemberian *voriconazole*. Apabila perforasi membran timpani tidak membaik, dapat dilakukan *tympaanoplasty* (*Aspergillus & Aspergillosis Website, 2009*).

### **2.1.6 Aspergillosis pada Pasien Immunocompromised**

Infeksi *Aspergillus* yang banyak menyerang pasien *immunocompromised* adalah *Invasive Aspergillosis (IA)*. IA ini memiliki empat tipe, yaitu 1) *acute or chronic pulmonary aspergillosis*; 2) trakeobronkitis dan penyakit obstruksi bronchial dengan berbagai derajat invasi mukosa dan tulang rawan serta pembentukan *pseudomembrane*, yang kebanyakan terdapat pada pasien AIDS;

3) invasif rhinosinusitis akut; dan 4) penyakit diseminasi yang menginvasi otak (sering pada pasien transplantasi sum-sum tulang) (Sturt dan Aberg, 2006).

Portal entry pada pathogenesis infeksi *Aspergillus* adalah melalui saluran napas. Spora dari *Aspergillus* masuk ke dalam percabangan bronkial, hingga ke alveoli, dimana jamur ini mulai melakukan kolonisasi dan inisasi penyakit invasif pada pasien *immunocompromised*. Hifa dari jamur ini dapat menginvasi pembuluh darah sehingga dapat menyebabkan inflamasi, trombosis, nekrosis dengan *marker hemorrhagic histopathologic* (Sturt dan Aberg, 2006).

Salah satu populasi yang rentan terhadap *Invasive Aspergillosis* adalah pasien HIV (*immunocompromised*). Data dari *Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease* (ASD) menunjukkan bahwa terdapat 228 kasus *Aspergillosis* yang menyerang 35.252 pasien HIV sehingga dapat disimpulkan terdapat 3,5 kasus *Aspergillosis* per 1.000 pasien per tahun. Insidens *Aspergillosis* ini meningkat pada orang-orang berumur 35 tahun lebih, laki-laki homoseksual, riwayat infeksi oportunistik dan CD4 <100 sel/ $\mu$ L (Sturt dan Aberg, 2006).

Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Kliasova *et al*, menghasilkan suatu data bahwa didapatkan temuan *Invasive Aspergillosis* pada 25 pasien *immunocompromised* yang diteliti. Etiologi pada 6,5% pasien tersebut disebabkan karena *Aspergillus niger*. Hal ini dibuktikan dengan terdeteksi adanya *Aspergillus* di dahak, *bronchoalveolar lavage*, serta antigen *Aspergillus* (*galactomannan*) di darah. Penelitian ini menyimpulkan bahwa penyakit yang disebabkan karena *Aspergillus* ini masih memiliki tingkat mortalitas yang tinggi, yaitu 52% (Kliasova *et al*, 2003).

### 2.1.7 Epidemiologi dan Pengendalian

*Aspergillus niger* dapat ditemukan pada tanah, kompos, dan tumbuhan mati. Selain itu, jamur ini juga sering didapatkan di lingkungan rumah sakit. Keberadaan *Aspergillus niger* ini menjadi faktor risiko yang besar bagi pasien *immunocompromised* untuk terserang *invasive* dan *allergic aspergillosis*. Sehingga, diperlukan pengawasan pada tempat-tempat yang berpotensi menjadi tempat tumbuhnya *Aspergillus niger*, terutama pada lingkungan rumah sakit (d'Halewyn dan Chevalier, 2014).

## 2.2 Teknik Preservasi Jamur

### 2.2.1. Definisi

Preservasi jamur adalah teknik penyimpanan untuk menjaga kultur dalam kondisi yang stabil. Preservasi ini berfokus dalam menjaga viabilitas, morfologi, fisiologi dan integritas gen (Nakasone *et al*, 2004). *Journal of Hygiene Sciences* menulis bahwa preservasi jamur banyak dibutuhkan untuk kepentingan proses industri atau untuk penelitian mikrobiologi. Penerapan preservasi jamur membutuhkan akses yang mudah terhadap pengecekan kultur karena hal ini dilakukan dalam tahap rutin untuk mengontrol kualitas kultur, uji komparasi dengan pengecekan yang telah dilakukan sebelumnya dan pengecekan keadaan kultur secara umum (Doelle, 2013) Penerapan preservasi jamur dapat dilakukan pada *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* adalah suatu spesies jamur yang memiliki kontribusi dalam memberikan keuntungan dan kerugian bagi makhluk hidup. Jamur ini selain dapat menyebabkan penyakit pada makhluk hidup seperti otomikosis, tetapi juga memiliki dampak positif. Seperti contohnya, *Aspergillus niger* dapat digunakan sebagai obat dan untuk produksi enzim dan asam sitrat

(Biyik *et al*, 2016) Maka dari itu, preservasi *Aspergillus niger* memiliki banyak

manfaat dalam bidang industri, klinis maupun untuk penelitian.

Preservasi jamur memiliki potensi untuk mengalami beberapa kerusakan, sehingga wajib dilakukan pemeliharaan yang baik dan benar untuk menghindari kerusakan ini. Salah satu kerusakan yang dapat terjadi saat melakukan preservasi adalah beberapa jenis jamur yang dapat melemah dan spora nya yang dapat hancur karena kondisi preservasi nya (suhu, tempat penyimpanan, dll). Selain itu, teknik preservasi jamur juga dapat mengalami kontaminasi, invasi tempat penyimpanan oleh serangga dan efek samping pada kultur karena pemberian suhu, cahaya, serta kelembaban tertentu (American Type Culture Collection (ATCC), 2011).

*Journal of Hygiene Sciences* menulis bahwa semua metode preservasi mengikuti protokol dan tahap yang sama, yaitu melalui pengecekan kultur, persiapan (pemberian label dan sterilisasi), penumbuhan kultur, suspensi sel pada media preservasi, dispensi suspensi sel, pemilihan metode preservasi, penyimpanan stok, perbaruan data stok, dan percobaan stok (viabilitas, kemurnian dan stabilitas gen) (Doelle, 2013)

Preservasi pada penelitian ini menggunakan metode penyimpanan *Aspergillus niger* pada suhu 4°C yang ditaruh ke dalam *cryotube* berisi gliserol 10% yang bekerja sebagai agen *cryoprotectant* untuk melindungi jamur dari kerusakan selama menjalani waktu preservasi. *Aspergillus niger* kemudian akan disubkultur atau dilakukan *revival* pada media SDA untuk diamati viabilitasnya dan diukur rerata diameter pertumbuhannya pada hari ke-5 dan hari-10 setelah *revival* selama 1 tahun masa preservasi.

### 2.2.2. Preservasi dengan *Mineral Oil*

Jurnal tentang preservasi fungi menulis bahwa penyimpanan jamur dengan menggunakan *mineral oil* merupakan suatu metode preservasi yang paling sederhana dan tidak mahal untuk preservasi kultur jangka panjang. Metode ini masih sering dilakukan di dunia karena hanya membutuhkan sedikit sumber daya dibandingkan dengan teknik preservasi jamur yang lain dan efektif untuk jamur yang tidak tahan terhadap metode *freeze-drying*. *Mineral oil* ini mencegah desikasi (proses pengeringan ekstrim) dan meminimalisir pertukaran gas, sehingga menurunkan metabolisme jamur menjadi sangat rendah. Prosedur ini membutuhkan pengecekan kultur secara rutin untuk inspeksi risiko terjadinya kontaminasi. Keuntungan dari metode ini adalah teknik nya yang cukup sederhana dan tidak membutuhkan biaya yang besar. Namun, faktor virulensi jamur dapat berkurang seiring dengan berjalannya waktu preservasi (American Type Culture Collection (ATCC), 2011).

### 2.2.3 Preservasi dengan *Serial Transfer*

Jurnal tentang preservasi fungi menulis bahwa preservasi kultur dengan menggunakan *serial transfer* ini sangat cocok untuk studi atau penelitian jangka pendek (beberapa minggu atau beberapa bulan). Metode preservasi ini memiliki beberapa kekurangan dan kelebihan. Keuntungan menggunakan metode ini adalah tekniknya yang sederhana. Sedangkan, kekurangan menggunakan preservasi dengan *serial transfer* adalah fenotip kultur yang dapat berubah, kebutuhan bahan dan tenaga kerja yang harus ada terus menerus untuk pengecekan kondisi kultur, dan juga potensi untuk terjadi perubahan pada

karakteristik kultur, seperti hilangnya patogenitas, faktor virulensi maupun sporulasi jamur (American Type Culture Collection (ATCC), 2011).

#### 2.2.4 Preservasi dengan *Distilled Water Stasis*

Jurnal tentang preservasi fungi menulis bahwa teknik ini dapat digunakan untuk beragam jenis jamur, terutama pada jenis jamur yang tidak dapat dilakukan *freeze-drying*, seperti *oomycetes*. Hartung de Capriles *et al* membuktikan bahwa viabilitas fungi menggunakan metode ini dapat bertahan selama 20 tahun, meskipun banyak juga jamur yang viabilitasnya berkurang lebih cepat melalui metode preservasi ini. Teknik ini membutuhkan tabung steril dengan tutup berupa *screw* dan *sterile water* (air kran dapat digunakan apabila *sterile water* tidak tersedia). Penyimpanan dengan menggunakan metode ini dapat dilakukan pada suhu ruang atau disimpan di kulkas. Keuntungan menggunakan metode preservasi ini adalah tekniknya yang sederhana. Tetapi, pengecekan kadar air dan risiko kontaminasi wajib dilakukan secara rutin (American Type Culture Collection (ATCC), 2011).

#### 2.2.5 Preservasi dengan *Silica Gel*

Jurnal tentang preservasi fungi menulis bahwa penyimpanan jamur dengan menggunakan *silica gel* membutuhkan kulkas dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Namun, penyimpanan jamur dengan inokulasi *silica gel* ini juga dapat disimpan pada suhu ruang dengan konsekuensi viabilitas jamur yang dapat berkurang secara lebih cepat. Lembaga American Type Culture Collection (ATCC) pada tahun 2011 menulis bahwa metode preservasi ini dapat menjaga viabilitas fungi hingga 10 tahun. Prosedur ini tidak membutuhkan biaya yang besar, tekniknya

sederhana dan dapat digunakan untuk banyak jenis jamur, kecuali jenis jamur

yang memiliki rasio volume vakuola terhadap sitoplasma yang tinggi, seperti

*oomycetes* dan *entomophthorales*. Keuntungan dari teknik preservasi ini adalah

tidak membutuhkan biaya yang cukup besar dan teknik nya juga sederhana.

Tetapi, kesuksesan preservasi ini sangat bergantung pada eratnya penutupan

tabung pada setiap perlakuan (American Type Culture Collection (ATCC), 2011).

### 2.2.6 Preservasi pada Suhu Ruang

Jurnal tentang preservasi fungi menulis bahwa metode preservasi yang

sangat sederhana adalah dengan menyimpan kultur pada suhu ruang. Dengan

menggunakan metode ini, kultur dapat disimpan pada lemari atau kontainer

tertutup sehingga kultur terlindungi dari kotoran, debu atau kontaminasi udara.

Lemari kayu dengan ventilasi yang baik terbukti dapat menyimpan kultur dengan

baik. Hal ini dikarenakan kayu tidak dapat menyalurkan panas dengan baik (*poor*

*conductor*), sehingga kultur tidak mengalami perubahan suhu yang cepat. Kriteria

lemari kayu yang digunakan juga wajib dalam keadaan kering untuk menghindari

suhu lembab dan juga wajib diberikan obat pengusir serangga beberapa minggu

sebelum penggunaan lemari ini. Keuntungan menggunakan metode preservasi

ini adalah tidak memerlukan biaya yang mahal untuk persediaan alat dan dapat

digunakan untuk beberapa jenis jamur yang sensitif. Namun, kerugian dalam

menggunakan metode ini adalah pengecekan kultur yang wajib dilakukan secara

rutin karena potensi mengalami kelembaban dan kontaminasi serangga yang

cukup besar. *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (C.B.S) telah membuktikan

bahwa kriteria yang baik untuk metode preservasi ini adalah penyimpanan pada

suhu 16-17°C dengan relatif kelembaban 60% (American Type Culture Collection (ATCC), 2011).

### 2.2.7 Preservasi dengan Tanah

Jurnal tentang preservasi jamur menulis bahwa preservasi jamur pada tanah membutuhkan inokulasi sebanyak 5 gram tanah dengan 20% kelembaban yang dimasukkan ke dalam autoklaf dua kali sebelum ditambahkan 1ml suspensi spora yang ditumbuhkan selama 10 hari pada suhu ruang, dan kemudian disimpan di kulkas. Tetapi, tidak banyak yang menggunakan metode preservasi ini karena belum jelas efektivitasnya (American Type Culture Collection (ATCC), 2011).

### 2.2.8 Penelitian Preservasi *Aspergillus* dengan Gliserol pada Suhu 4°C

Penelitian yang dilakukan oleh Jai Shankar Paul *et al* pada tahun 2015 meliputi preservasi 15 jenis jamur (*Aspergillus niger* sebagai salah satu jenis jamur yang dipakai) di berbagai konsentrasi gliserol (5% gliserol, 15% gliserol, 50% gliserol dan *crude* gliserol) sebagai *cryoprotectant* dengan menggunakan dua metode yang berbeda, yaitu dengan menggunakan metode *slant culture* dan *slice cut*. Hasil dari penelitian yang dilakukan ini menunjukkan bahwa *Aspergillus niger viable* selama 18 bulan pada 5% gliserol dan 24 bulan pada 50% gliserol pada suhu 4° C. Paul *et al* memilih untuk melakukan preservasi berbagai jamur ini pada kulkas dengan suhu 4° C karena mudah dilakukan dan biaya nya yang terjangkau (murah), terutama apabila dibandingkan dengan preservasi menggunakan *liquid nitrogen* yang sulit dijangkau dari segi biaya maupun teknik pelaksanaannya. Preservasi dengan gliserol juga dilakukan untuk menjaga

aktivitas regenerasi dan mencegah kerusakan jamur selama masa preservasi (Paul *et al*, 2015). Penelitian ini dan penelitian yang dilakukan oleh Jai Shankar Paul *et al* berbeda dalam aspek penelitian ini hanya menggunakan *Aspergillus niger* sebagai isolat jamur dengan gliserol 10% sebagai *cryoprotectant* yang disimpan dalam suhu 4° C, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Paul *et al* menggunakan berbagai spesies *Aspergillus* dengan berbagai macam konsentrasi gliserol.

### 2.2.9 Preservasi dengan *Cryoprotectant*

Dari beberapa metode preservasi jamur yang telah banyak dilakukan di dunia, salah satu metode preservasi yang sering dilakukan adalah dengan penggunaan *cryoprotectant*. Beberapa keuntungan dari penggunaan *cryoprotectant* adalah kebutuhan biaya yang rendah, tingkat kesuksesan yang tinggi serta densitas sel selama preservasi akan tetap terjaga (Alonso, 2016).

*Cryoprotectant* yang digunakan untuk preservasi bekerja dengan cara menurunkan titik leleh cairan sehingga jaringan dan organ dapat membeku di sekitarnya tetapi tidak dalam sel itu sendiri. Terdapat banyak *cryoprotectant* yang telah digunakan tetapi yang paling sering digunakan untuk preservasi adalah gliserol. Penelitian yang dilakukan oleh Bhattacharya menunjukkan bahwa masalah dalam preservasi dalam suhu tinggi seperti integritas sel selama penyimpanan dan *freezing injury* dapat dikurangi dengan menggunakan *cryoprotectant* (Bhattacharya, 2018).

Gliserol memiliki properti kosmotropik yang baik, dengan cara membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air. Kondisi ini mencegah terbentuknya kristal es kecuali kultur berada pada suhu sangat rendah seperti -37,8°C. Dibandingkan

dengan *cryoprotectant* lain, gliserol memiliki toksisitas yang rendah pada konsentrasi tinggi (Bhattacharya, 2018).

Suatu jurnal yang membahas tentang prinsip dasar kriopreservasi menulis bahwa gliserol memiliki sifat hipertonik. Sel yang dimasukkan ke dalam gliserol yang bersifat hipertonik akan menyebabkan air meninggalkan sel karena perbedaan tekanan osmotik nya, tetapi dalam waktu yang bersamaan, gliserol akan masuk ke dalam sel tersebut. Setelah mengalami proses *equilibrium* atau keseimbangan, sel akan mulai kembali ke volume asal nya. Air ekstraseluler dan intraseluler akan tergantikan oleh gliserol sehingga kadar es yang terbentuk pada preservasi jamur di suhu rendah tidak akan tinggi, bagian yang tidak beku akan lebih banyak dan derajat penyusutan sel akan terbatas (FAO, 2012).

Penelitian ini menggunakan gliserol 10% sebagai agen *cryoprotectant* karena kemampuannya yang dapat menjaga aktivitas regenerasi sel dan mencegah kerusakan jamur saat menjalani preservasi. Meskipun terdapat berbagai macam konsentrasi gliserol yang dapat digunakan, tetapi gliserol 10% memiliki kelebihan dalam hal konsentrasi ini dapat digunakan untuk semua jenis jamur dan pembuatannya juga mudah (Paul *et al*, 2015).

### 2.3 Sabouraud Dextrose Agar sebagai Media Pertumbuhan *Aspergillus*

SDA adalah media selektif yang utamanya dapat digunakan untuk isolasi dermatofit, jamur, ragi dan juga bakteri berfilamen seperti *Nocardia*. pH dari media ini yang bersifat keasaman (pH 5) menghambat pertumbuhan bakteri tetapi dapat menumbuhkan jamur berfilamen. Komposisi dari SDA ini adalah *mycological peptone* (kasein yang dicerna secara enzimatik dan *jaringan hewan*), *dextrose*, agar dan pH 5. Kasein yang dicerna secara enzimatik dan jaringan

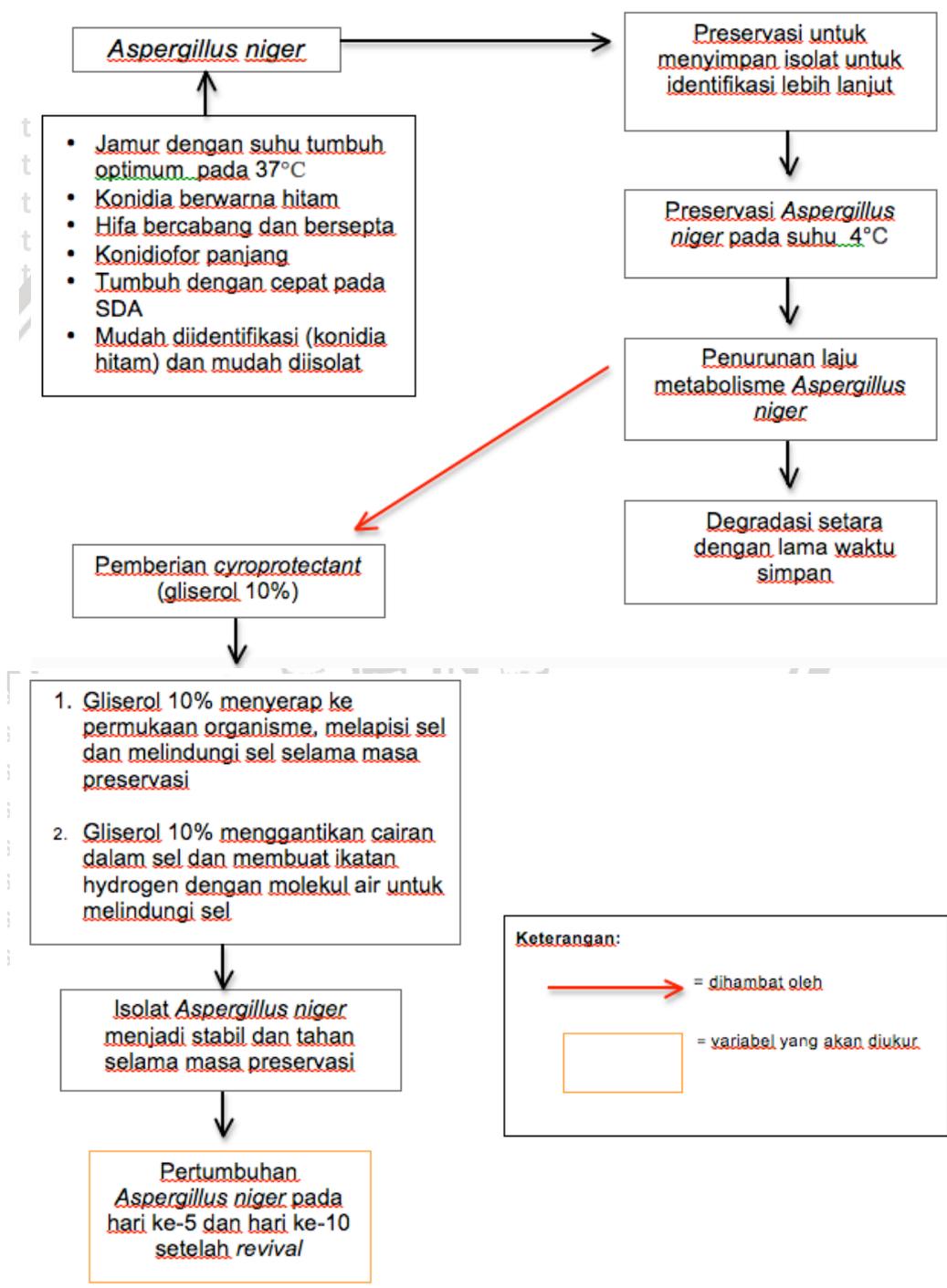
hewan dapat memberikan sumber nutrisi asam amino dan *nitrogenous compound* untuk pertumbuhan jamur. *Dextrose* adalah karbohidrat yang dapat difermentasikan dalam konsentrasi tinggi yang berfungsi sebagai sumber energi dan karbon. Agar berfungsi sebagai *solidifying agent*. Salah satu jamur yang dapat ditumbuhkan pada media SDA ini adalah *Aspergillus niger* dengan pertumbuhan awal koloni berwarna putih yang berkembang menjadi berwarna hitam karena konidia nya yang berwarna gelap (Rijal, 2015).



BAB 3

KERANGKA KONSEP PENELITIAN DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep Penelitian

### 3.1.1 Penjelasan Kerangka Konsep

Penggunaan suhu 4°C saat preservasi akan menyebabkan isolat *Aspergillus niger* mengalami penurunan metabolisme dan penurunan kemampuan sel untuk regenerasi (Paul *et al*, 2015). Maka dari itu, dibutuhkan suatu *cryoprotectant* untuk menjaga kemampuan regenerasi dan untuk mencegah kerusakan sel. Penggunaan *cryoprotectant* pada suhu rendah sangat efisien dalam menjaga fungsi sel, baik dalam segi pertumbuhan, morfologi atau produksi metabolit (Homolka, Lisá, & Nerud, 2006). Gliserol 10% dipilih untuk digunakan sebagai *cryoprotectant* pada penelitian ini karena merupakan *cryoprotectant* yang dapat digunakan oleh beragam spesies jamur. Gliserol 10% dapat menyerap ke permukaan organisme, melapisi sel dan melindungi sel selama masa preservasi. Selain itu, gliserol 10% juga dapat menggantikan cairan dalam sel dan membuat ikatan hidrogen dengan molekul air untuk melindungi sel. Sehingga, *cryoprotectant* ini dapat berperan dalam menjaga pertahanan isolat untuk bertahan dalam jangka waktu yang panjang selama masa preservasi jamur (Lalaymia *et al*, 2014).

Pengaruh preservasi gliserol 10% pada suhu 4°C terhadap viabilitas *Aspergillus niger* dapat dilihat dengan mengukur rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada SDA di hari ke-lima dan di hari ke-sepuluh setelah *revival*.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Efek preservasi gliserol 10% pada suhu 4°C adalah *Aspergillus niger* tetap *viable* selama 1 tahun periode preservasi secara *in vitro*.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama preservasi terhadap rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger*. Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *experimental-post test only with control group design* dengan basis awal menggunakan pertumbuhan kelompok induk *Aspergillus niger*. Fokus penelitian adalah rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* setelah perlakuan berupa pemberian gliserol 10% yang disimpan pada suhu 4°C melalui metode pengukuran rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada SDA.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel jamur uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat terpreservasi *Aspergillus niger* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu lama preservasi (dua minggu hingga satu tahun).

##### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada SDA di hari ke-lima dan hari ke-sepuluh setelah *revival* yang didefinisikan dalam satuan milimeter (mm).

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Mei 2018 hingga bulan Mei 2019. Masa *revival* adalah per dua bulan / empat minggu.

#### 4.5 Definisi Operasional

- a. *Aspergillus niger* adalah jamur multiseluler yang digunakan pada penelitian ini. Sisi atas koloni *Aspergillus niger* pada SDA tersusun atas hifa yang berwarna hitam, bergranuler karena memiliki banyak konidia sehingga permukaannya terlihat seperti berpasir dan sisi tepi koloni berwarna putih. Sisi dasar koloni *Aspergillus niger* berwarna kuning pucat dengan *radial groove* yang jelas.
- b. Lama preservasi didefinisikan sebagai waktu yang digunakan untuk menyimpan isolat *Aspergillus niger* pada suhu 4°C. Lama preservasi adalah 1 tahun dengan rentang *revival* dilakukan setiap 2 bulan.
- c. Suhu alat pendingin untuk menyimpan isolat *Aspergillus niger* adalah 4°C.
- d. Rerata diameter pertumbuhan koloni *Aspergillus niger* dihitung menggunakan penggaris pada empat diameter koloni dengan satuan millimeter yang kemudian dihitung reratanya. Perhitungan rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* dilakukan pada hari ke-lima dan hari ke-sepuluh setelah *revival*.
- e. Preservasi didefinisikan sebagai proses penyimpanan isolat *Aspergillus niger* yang dilakukan dengan memasukkan empat lempeng isolat *Aspergillus niger* ke dalam *cryotube* 1.5ml berisi 1cc gliserol steril 10%.
- f. *Revival* didefinisikan sebagai proses re-kultur isolat yang telah menjalani preservasi selama waktu yang telah ditentukan. Empat *cryotube* diambil

dari tempat preservasi untuk setiap proses *revival*. *Cryotube* yang sudah digunakan untuk *revival* tidak digunakan untuk proses *revival* berikutnya.

g. Kelompok induk didefinisikan sebagai kelompok awal dalam preservasi yang merupakan hasil subkultur dari satu koloni awal ke dalam 2 media

SDA dan diikuti dengan inkubasi selama 10 hari.

h. Kelompok kontrol didefinisikan sebagai kelompok pasca preservasi yang menjalani *revival* setelah disimpan selama 2 minggu. Kelompok ini merupakan pembuktian bahwa proses preservasi tidak membunuh jamur.

Pengukuran rerata diameter juga dilakukan untuk kelompok kontrol ini.

i. Kelompok perlakuan didefinisikan sebagai kelompok yang menjalani *revival* sesuai waktu yang telah ditentukan dalam hitungan bulan (2 bulan, 4 bulan, 6 bulan, 8 bulan, 10 dan 12 bulan).

j. Lempeng isolat adalah lempengan SDA yang telah ditumbuhi *Aspergillus niger*. Lempeng ini diambil dengan menggunakan batang sedotan steril.

#### 4.6. Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.6.1 Alat

- a. Inkubator 37°C
- b. Kulkas 4°C
- c. Otoklaf
- d. Kotak penyimpanan
- e. Ose / *disposable loop* steril
- f. Labu Erlenmeyer
- g. *Strirrer* magnetik
- h. Mikropipet 1000µL
- i. Alat ukur (penggaris, spidol, dll)

#### 4.6.2 Bahan

- a. Isolat *Aspergillus niger*
- b. SDA
- c. Cryotube 1.5 cc
- d. Distilled water
- e. Gliserol 10%
- f. Blue tip
- g. Cawan petri 90mm
- h. Mika bening
- i. Sedotan tahan panas steril, dipotong dengan panjang sekitar 5cm
- j. Tusuk gigi steril
- k. Pinset steril
- l. Larutan lisol
- m. Isolasi bening
- n. Kantong plastic

#### 4.7 Prosedur penelitian

##### 4.7.1 Tahap 1. Penghitungan Gliserol dan Preservasi

###### 1. Rumus

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

$$V_1 \times 92\% = 60 \times 10\%$$

$$92 \times V_1 = 600$$

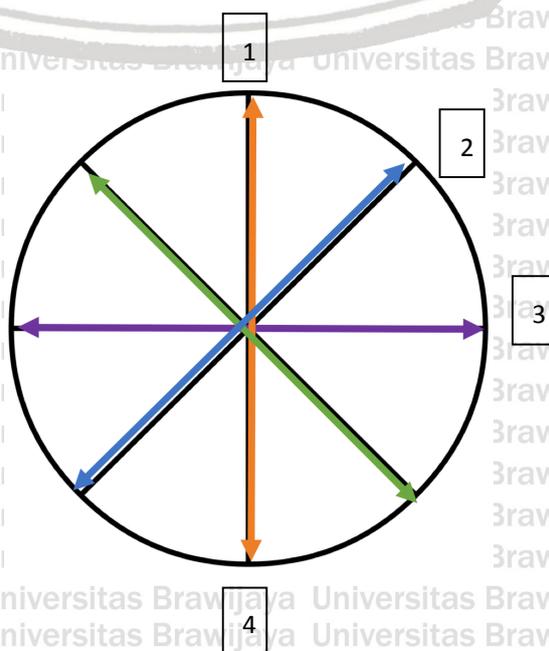
$$V_1 = 600 / 92$$

$$V_1 = 6,52 \rightarrow \text{dibulatkan menjadi } 7 \text{ cc gliserol } 92\%$$

2. *Revival* pada minggu kedua, bulan ke-2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24. Dibulatkan menjadi 15 kali *revival*
3. Setiap *revival* dibutuhkan 4 *cryotube* sehingga 15 *revival* (karena target awal preservasi adalah untuk 2 tahun)  $\times$  4 *cryotube* = 60 *cryotube*
4. 60 *cryotube* = 1 cc = 60 cc
5. 60 cc dilebihi 5 cc  $\rightarrow$  65 cc gliserol 10%
6. 65 cc gliserol 10% - 7 cc gliserol 92% = 58 cc aquadest untuk melarutkan gliserol 10% dan gliserol 92%
7. Campuran dihomogenisasi dengan menggunakan *stirrer* magnetik hingga benar-benar homogen
8. Sebanyak 1 cc larutan dimasukkan ke dalam 60 *cryotube* berukuran 1.5 cc
9. Seluruh *cryotube* yang telah diisi dengan 1 cc larutan, disterilisasi dengan otoklaf 121°C 15psi selama 15 menit
10. Empat lempeng isolat dari kelompok induk dimasukkan kedalam satu *cryotube* dengan bantuan dorongan tusuk gigi steril pada sedotan steril. *Cryotube* yang telah diisi diijarkan sesuai urutan pengisian lempeng agar. Untuk setiap satu kelompok perlakuan, diambil empat *cryotube*. Masing-masing kelompok disatukan dengan menggunakan isolasi bening.
11. Semua *cryotube* dimasukkan ke dalam wadah dan dipreservasi pada suhu 4°C (60 *cryotube*) hingga waktu yang ditentukan, yaitu 2 minggu, 2 bulan, 4 bulan, 6 bulan, 8 bulan, 10 bulan dan 12 bulan.

#### 4.7.2 Tahap 2. Revival dan Pengukuran

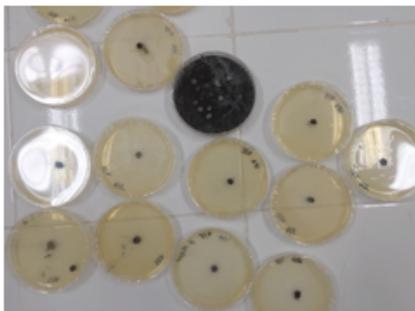
1. Sebelum digunakan, SDA diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit dan diberi label berisi nama isolat, inisial peneliti dan tanggal perlakuan.
2. *Cryotube* berisi isolat *Aspergillus niger* yang telah tersimpan dalam suhu  $4^{\circ}\text{C}$  ditransfer ke suhu  $37^{\circ}\text{C}$  (proses *thawing*).
3. Lempeng isolat *Aspergillus niger* pada *cryotube* no. 2 diambil dengan menggunakan ose steril dan diletakkan pada bagian tengah SDA.
4. Isolasi bening diberikan melingkar pada tepi SDA untuk mencegah kontaminasi.
5. SDA diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 10 hari dengan rincian pengamatan diameter dilakukan pada hari ke-lima dan hari ke-sepuluh. Pengukuran dilakukan pada empat diameter kemudian diambil rerata nya sebagai "diameter koloni". Pengukuran dibantu dengan menggambar lingkaran yang dibagi menjadi 8 area pada mika bening dan menempelkan mika tersebut di bagian basal koloni. Metode pengukuran diameter dan penyimpanan data diameter dalam table adalah sebagai berikut.



Isolat/ Suhu preservasi/ Inkubasi/ Plate ke	Diameter 1 (mm) (warna merah)	Diameter 2 (mm) (warna biru)	Diameter 3 (mm) (warna ungu)	Diameter 4 (mm) (warna hijau)	Diameter koloni (mm)
<i>A.niger</i> 4°C/ 37°C/ 1	.....mm	.....mm	.....mm	.....mm	.....mm (rerata diameter 1-4)
<i>A.niger</i> 4°C/ 37°C/ 2	.....mm	.....mm	.....mm	.....mm	.....mm (rerata diameter 1-4)
<i>A.niger</i> 4°C/ 37°C/ 3	.....mm	.....mm	.....mm	.....mm	.....mm (rerata diameter 1-4)
					...dst

(Miyashira *et al*, 2010)

### 4.7.3 Tahap 3. Penjelasan Cara Penelitian



Gambar 4.1 Pembuatan kelompok induk

Pembuatan kelompok induk:

- 14 plate SDA (penelitian ini hanya membutuhkan 2 media SDA) diberikan inkulasi 1 lempeng isolat *Aspergillus niger* pada bagian tengah SDA dengan bantuan dorongan tusuk gigi steril pada sedotan steril



Gambar 4.2 Contoh kelompok kontrol

Contoh kelompok kontrol:

- Kelompok kontrol adalah kelompok yang menjalani revival setelah penyimpanan selama 2 minggu
- Sebagai pembuktian bahwa proses preservasi tidak membunuh isolat *Aspergillus niger*



Gambar 4.3 Pembuatan gliserol 10%

Pembuatan gliserol 10%:

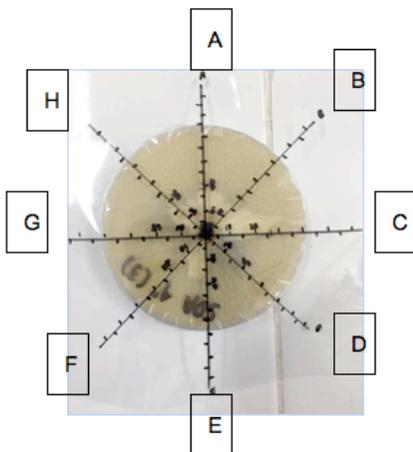
- 1cc gliserol 10% dimasukkan ke dalam 60 *cryotube* berukuran 1.5cc yang kemudian disterilisasi dengan otoklaf 121°C 15psi selama 15 menit
- Masing-masing *cryotube* diisi dengan 4 lempeng isolat *Aspergillus niger*, 4 *cryotube* kemudian disatukan dengan menggunakan isolasi bening dan disimpan di kulkas bersuhu 4°C yang nantinya 4 *cryotube* tersebut akan dipakai untuk setiap *revival*.



Gambar 4.4 Revival

Tahap Revival:

- Setiap *revival* membutuhkan 4 SDA *plate* + 4 *cryotube* berisi *Aspergillus niger*
- 1 lempeng isolat *Aspergillus niger* ditumbuhkan di tengah-tengah SDA *plate* dengan menggunakan ose steril
- Masing-masing SDA *plate* diisolasi dengan isolasi bening dan dikumpulkan dalam 1 kantong plastik dan diletakkan di inkubator 4°C



Gambar 4.5 Pengukuran rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger*

Pengukuran pada setiap *revival*.

- Pengukuran dilakukan mulai dari tengah-tengah SDA (letak lempeng *Aspergillus niger* ditumbuhkan) hingga ke area yang tidak ditumbuhi oleh *Aspergillus niger*. Pengukuran dilakukan menggunakan mika bening dan penggaris
- Hasil dari sumbu A + E, B + F, C + G, D + H. Kemudian 4 hasil tersebut diambil rerata nya dalam satuan millimeter (mm)
  - Contoh:
    - A + E = 38 + 40 = 78
    - B + F = 40 + 39 = 79
    - C + G = 40 + 38 = 78
    - D + H = 39 + 38 = 77
- Pengukuran dilakukan pada hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival*

#### 4.8. Analisis Data

Data variabel terikat dan data variabel bebas yang akan terkumpul merupakan data yang bersifat numerik. Data akan dianalisis menggunakan pendekatan pertumbuhan *Aspergillus niger* dan korelasinya dengan waktu lama simpan.

##### 4.8.1. Pendekatan Waktu Lama Simpan

Data akan didapatkan sebagai dua variabel numerik. Analisis data dilakukan sebagai berikut:

###### 1. Uji Normalitas

Normalitas data diuji dengan menggunakan *Shapiro Wilk Test* atau *Kolmogorov Smirnov Test*. Apabila angka  $p > 0.05$  maka dapat disimpulkan bahwa data tersebar normal.

###### 2. Uji homogenitas

Homogenitas data diuji dengan menggunakan *Levene Test*. Apabila angka  $p > 0.05$ , maka dapat disimpulkan bahwa data bersifat homogen.

Apabila:

- Data tersebar normal dan homogen, maka uji yang dilakukan adalah uji parametrik.
- Data tidak tersebar normal namun homogen / data tersebar normal namun tidak homogen / data tidak tersebar normal dan tidak homogen, maka uji lanjutan yang dilakukan adalah uji non-parametrik.

3. Uji komparasi

Untuk data parametrik, uji yang dilakukan adalah *Independent T Test*, sedangkan untuk data non-parametrik, uji yang dilakukan adalah *Mann Whitney U Test*. Variabel tergantung adalah rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* dalam waktu 5 dan 10 hari. Variabel bebas adalah waktu lama simpan. Uji komparasi antar kelompok dilakukan menggunakan *Post Hoc Tukey Test* dengan data pada hari ke-lima dan hari ke-sepuluh setelah *revival*.



## BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

## 5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Rerata Diameter Pertumbuhan *Aspergillus niger*

Penelitian ini menggunakan sampel berupa satu isolat *Aspergillus niger* yang di peroleh dari isolat Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Preservasi *Aspergillus niger* dilakukan menggunakan gliserol 10% pada suhu 4°C untuk melihat viabilitas *Aspergillus niger* yang telah di preservasi selama periode 1 tahun dengan cara mengukur rerata diameter pertumbuhannya pada 4 SDA plate untuk setiap revival.

Revival *Aspergillus niger* dilakukan sebanyak 7 kali dalam periode 1 tahun yang dimulai pada tanggal 28 Mei 2018 hingga 17 Mei 2019 dan diukur diameter pertumbuhannya pada 4 SDA plate setiap hari ke-5 dan hari ke-10 setelah revival.

Revival pertama dilakukan pada tanggal 28 Mei 2018. Hasil dari data pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 setelah revival (1 Juni 2018) dan hari ke-10 setelah revival (6 Juni 2018) adalah sebagai berikut.



Gambar 5.1 Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah revival pertama pada 4 SDA plate tampak depan dan belakang

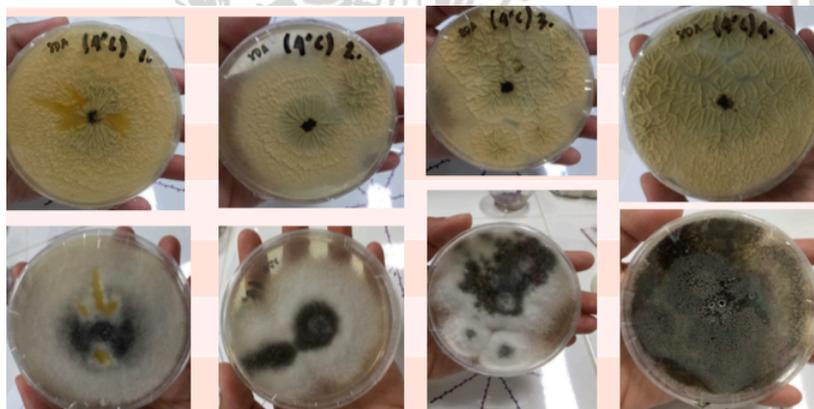


**Gambar 5.2** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-10 setelah *revival* pertama pada 4 SDA *plate* tampak belakang

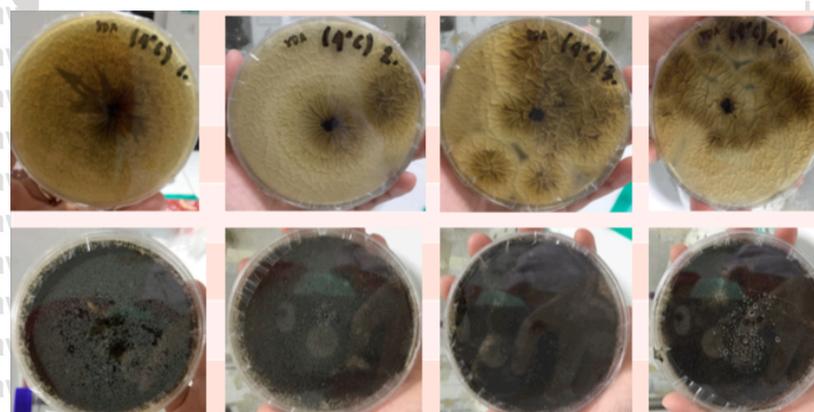
Pada *revival* pertama ini, diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-10 setelah *revival* tampak lebih penuh mengelilingi seluruh 4 SDA *plate* dibandingkan dengan pertumbuhannya pada hari ke-5 setelah *revival*.

*Aspergillus niger* pada gambar di atas dapat diidentifikasi dengan konidianya yang berwarna hitam dan koloni berwarna putih.

*Revival* kedua dilakukan pada tanggal 20 Juli 2018. Hasil dari data pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 setelah *revival* (25 Juli 2018) dan hari ke-10 setelah *revival* (30 Juli 2018) adalah sebagai berikut.



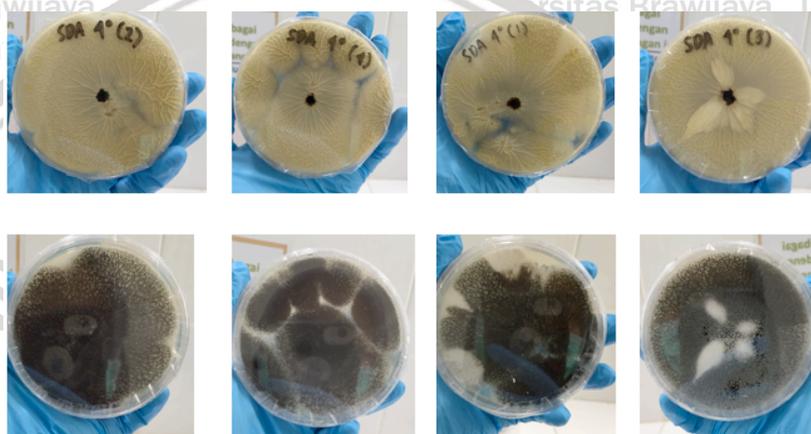
**Gambar 5.3** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah *revival* kedua pada 4 SDA *plate* tampak depan dan belakang



**Gambar 5.4** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-10 setelah *revival* kedua pada 4 SDA *plate* tampak depan dan belakang

Seperti pada *revival* pertama, hasil pada *revival* kedua ini menunjukkan bahwa diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* tumbuh lebih penuh mengelilingi seluruh 4 SDA *plate* pada hari ke-10 setelah *revival* dibandingkan dengan pertumbuhannya pada hari ke-5 setelah *revival*.

*Revival* ketiga dilakukan pada tanggal 21 September 2018. Hasil dari data pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 setelah *revival* (26 September 2018) dan hari ke-10 setelah *revival* (1 Oktober 2018) adalah sebagai berikut.



**Gambar 5.5** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah *revival* ketiga pada 4 SDA *plate* tampak depan dan belakang



**Gambar 5.6** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-10 setelah *revival* ketiga pada 4 SDA *plate* tampak depan dan belakang

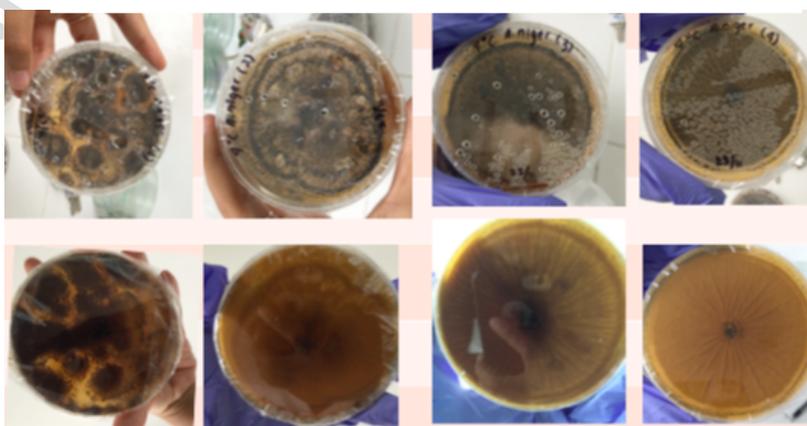
Pengamatan pada *revival* ketiga menunjukkan hasil yang sama dengan hasil pertumbuhan pada *revival* pertama dan kedua, dimana diameter

pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 setelah *revival* tidak mengelilingi SDA plate secara penuh dibandingkan dengan diameternya pada hari ke-10 setelah *revival*.

*Revival* keempat dilakukan pada tanggal 23 November 2018. Hasil dari data pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 setelah *revival* (28 November 2018) dan hari ke-10 setelah *revival* (3 November 2018) adalah sebagai berikut.



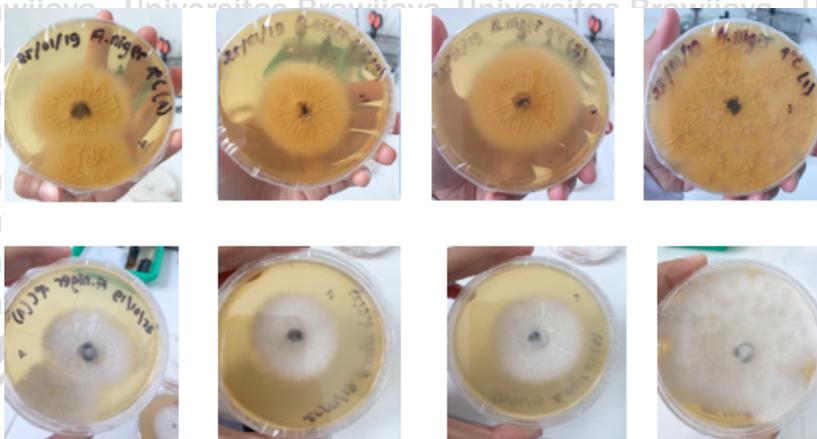
**Gambar 5.7** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah *revival* keempat pada 4 SDA plate tampak belakang



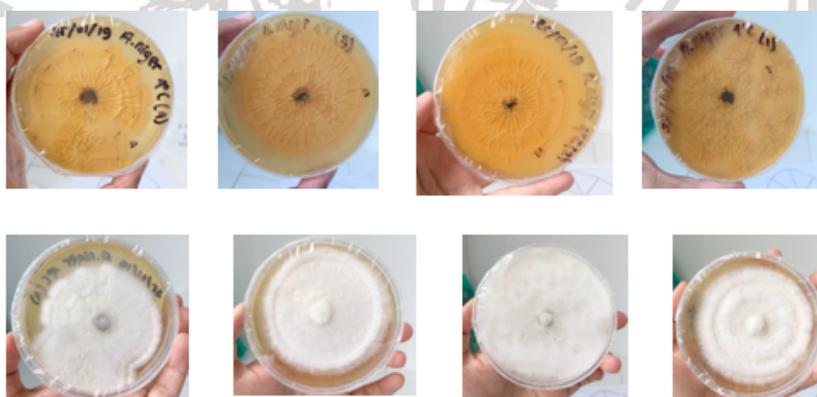
**Gambar 5.8** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-10 setelah *revival* keempat pada 4 SDA plate tampak depan dan belakang

Pada *revival* keempat ini, diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah *revival* mulai mengalami penurunan ketika dibandingkan dengan hari ke-5 pada *revival* pertama, kedua dan ketiga. Tetapi, ketika pertumbuhannya di hari ke-5 dibandingkan dengan pertumbuhan di hari ke-10, tampak diameter pertumbuhan yang lebih penuh pada keempat SDA plate pada hari ke-10 setelah *revival*.

Revival kelima dilakukan pada tanggal 25 Januari 2019. Hasil dari data pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 setelah revival (30 Januari 2019) dan hari ke-10 setelah revival (4 Februari 2019) adalah sebagai berikut.



**Gambar 5.9** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah revival kelima pada 4 SDA plate tampak depan dan belakang



**Gambar 5.10** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-10 setelah revival kelima pada 4 SDA plate tampak depan dan belakang

Revival kelima ini menunjukkan hasil yang sama seperti revival pertama, kedua, ketiga dan keempat dimana diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-10 setelah revival lebih penuh mengelilingi 4 SDA plate dibandingkan dengan pertumbuhannya di hari ke-5 setelah revival. Tetapi pada revival kelima ini mulai tampak banyak pertumbuhan gambaran berwarna putih pada tampak depan maupun pada tampak belakang 4 SDA plate dengan gambaran koloni

*Aspergillus niger* berwarna hitam yang terletak di tengah-tengah *plate*.

Gambaran berwarna putih ini tidak terlihat pada beberapa *revival* sebelumnya.

*Revival* keenam dilakukan pada tanggal 22 Maret 2019. Hasil dari data pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 setelah *revival* (27 Maret 2019) dan hari ke-10 setelah *revival* (1 April 2019) adalah sebagai berikut.



**Gambar 5.11** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah *revival* keenam pada 4 SDA *plate* tampak depan dan belakang



**Gambar 5.12** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-10 setelah *revival* keenam pada 4 SDA *plate* tampak depan dan belakang

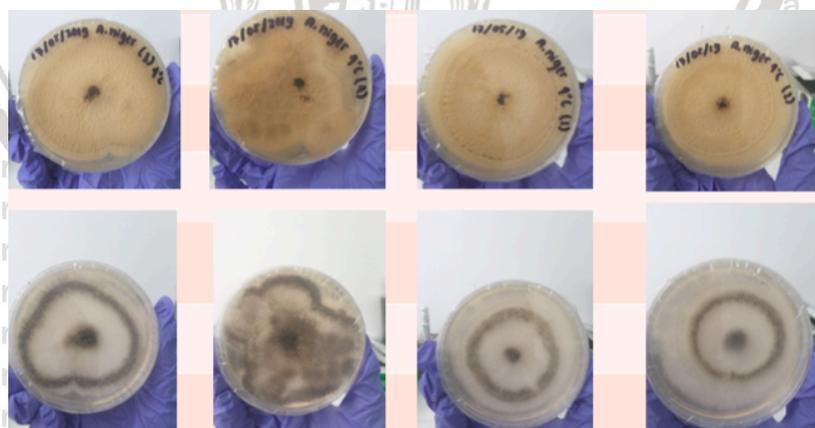
Pada *revival* keenam ini, baik hari ke-5 maupun hari ke-10 setelah *revival* menunjukkan hasil rerata diameter pertumbuhan yang menurun dibandingkan dengan lima *revival* sebelumnya. *Revival* keenam ini juga tetap menghasilkan banyak pertumbuhan gambaran berwarna putih pada 4 SDA *plate* seperti pada

revival kelima. Namun, gambaran koloni hitam *Aspergillus niger* di revival ini tampak lebih besar dibandingkan dengan koloni hitam *Aspergillus niger* pada revival kelima. Diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-10 setelah revival tampak lebih penuh mengelilingi 4 SDA plate dibandingkan dengan pertumbuhannya pada hari ke-5 setelah revival.

Revival terakhir, yaitu revival ketujuh dilakukan pada tanggal 17 Mei 2019. Hasil dari data pertumbuhan *Aspergillus niger* pada hari ke-5 setelah revival (22 Mei 2019) dan hari ke-10 setelah revival (27 Mei 2019) adalah sebagai berikut



**Gambar 5.13** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah revival ketujuh pada 4 SDA plate tampak depan dan belakang



**Gambar 5.14** Pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-10 setelah revival ketujuh pada 4 SDA plate tampak depan dan belakang

Pada *revival* ketujuh ini, diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah *revival* menunjukkan hasil yang sama dengan 6 *revival* sebelumnya, dimana diameter pertumbuhannya pada 4 SDA *plate* tidak sepuh pada pertumbuhannya di hari ke-10 setelah *revival*. Tetapi, di *revival* ini tetap tampak gambaran berwarna putih di 4 SDA *plate* tampak depan dan belakang. Apabila dibandingkan dengan hasil pertumbuhan *Aspergillus niger* pada *revival* keenam, koloni hitam pada *revival* keenam hanya terdapat di tengah-tengah SDA *plate*, sedangkan koloni hitam pada *revival* ketujuh ada di tengah-tengah SDA *plate* dan juga mengelilingi koloni putih seperti yang dapat dilihat di gambar 5.14.

Hasil perhitungan dari rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada 4 SDA *plate* dalam satuan milimeter (mm) dapat dilihat pada tabel 5.1 berikut.

**Tabel 5.1** Hasil diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada 4 SDA *plate* yang diukur di hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival* dalam 7 kali *revival* selama periode 1 tahun

No. <i>Revival</i>	Rerata diameter hari ke-5 setelah <i>revival</i> (mm)				Rerata diameter hari ke-10 setelah <i>revival</i> (mm)			
	Plate 1	Plate 2	Plate 3	Plate 4	Plate 1	Plate 2	Plate 3	Plate 4
1	78	80,25	77,5	90	90	90	90	90
2	90	73,25	78,75	90	90	90	90	90
3	77,75	80	90	90	79,25	80,5	90	90
4	70,54	64,75	70,75	75	77,84	90	90	90
5	79,5	43,75	52,5	68,25	90	74,5	76,75	72,25
6	55,25	55,75	58,5	40,87	75,25	74,75	90	79,75
7	60,5	56,75	66,25	76,25	75,35	75	75,25	78,25

## 5.2 Analisis Data

### 5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Yang dilakukan pertama kali dalam analisis data yaitu melakukan uji normalitas pada data untuk hari ke-5 setelah *revival* dan untuk hari ke-10 setelah *revival* dengan menggunakan *One Sample Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui

data sampel penelitian berasal dari populasi yang berdistribusi normal. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi 0.438 ( $p > 0.05$ ) untuk hari ke-5 setelah *revival* dan hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi 0.377 ( $p > 0.05$ ) untuk hari ke-10 setelah *revival*, sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal (parametrik). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian dengan tujuan untuk mengetahui bahwa kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama. Hasil uji homogenitas varian dengan *Levene Test Homogeneity of Variance* didapatkan nilai signifikansi 0.038 ( $p > 0.05$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa variasi tiap sampel tidak homogen. Hasil uji normalitas dan homogenitas dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut.

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Data

<u>Uji Normalitas dan Homogenitas</u>	<b>P-Value</b>
<u>Uji Normalitas hari ke-5 (Shapiro-Wilk)</u>	0.438
<u>Uji Normalitas hari ke-10 (Shapiro-Wilk)</u>	0.377
<u>Uji Homogenitas (Levene Test)</u>	0.038

### 5.2.2 Uji Mann Whitney U Test

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa sampel berdistribusi normal dan memiliki variasi tidak homogen sehingga dapat dilakukan uji statistik non-parametrik yaitu *Mann Whitney U Test*. Uji ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival* selama periode 1 tahun. Hasil *Mann Whitney U Test* didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.053 ( $p < 0.05$ ) dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* yang diukur pada hari ke-5 dan di hari

ke-10 setelah revival selama periode 1 tahun yang dapat dilihat pada tabel 5.3 berikut.

Tabel 5.3 Hasil Uji Mann Whitney U Test

Keterangan	P-value
Uji Mann Whitney U Test	0.438

### 5.2.3 Uji Post Hoc Tukey Test Hari ke-5 setelah Revival

Setelah dilakukan Mann Whitney U Test, dilakukan uji Post Hoc Tukey Test untuk dapat mengetahui perbandingan rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* antar revival pada data yang diukur di hari ke-5 setelah revival dalam periode 1 tahun yang dapat dilihat pada tabel 5.4 berikut.

Tabel 5.4 Hasil Post Hoc Tukey Test pada hari ke-5 setelah revival

HARI 5	Revival 1	Revival 2	Revival 3	Revival 4	Revival 5	Revival 6	Revival 7
Revival 1							
Revival 2	0.767						
Revival 3	0.554	0.758					
Revival 4	0.021	0.042	0.020				
Revival 5	0.083	0.081	0.042	0.386			
Revival 6	0.021	0.020	0.020	0.021	0.564		
Revival 7	0.021	0.042	0.020	0.386	0.773	0.043	

Hasil dari data Post Hoc Tukey Test pada hari ke-5 setelah revival adalah sebagai berikut:

- Terdapat perbedaan yang tidak signifikan pada data hari ke-5 setelah revival, antara revival 1 dan 2, antara revival 1 dan 3, antara revival 1 dan 5, antara revival 2 dan 3, antara revival 2 dan 5, antara



revival 4 dan 5, antara revival 4 dan 7, antara revival 5 dan 6, serta antara revival 5 dan 7.

- Terdapat perbedaan yang signifikan pada data hari ke-5 setelah revival, antara revival 1 dan 4, antara revival 1 dan 6, antara revival 1 dan 7, antara revival 2 dan 4, antara revival 2 dan 6, antara revival 2 dan 7, antara revival 3 dan 4, antara revival 3 dan 5, antara revival 3 dan 6, antara revival 3 dan 7, antara revival 4 dan 6, serta antara revival 6 dan 7.

Berdasarkan data uji *Post Hoc Tukey Test* dengan data di hari ke-5 setelah revival, dapat disimpulkan bahwa pertumbuhan *Aspergillus niger* saat dibandingkan pada revival pertama dan revival terakhir (revival ketujuh) menunjukkan rerata diameter yang signifikan dengan hasil signifikansi sebesar 0.021 ( $p < 0.05$ ). Sedangkan, apabila rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 setelah revival dibandingkan antara revival pertama dan revival kedua menunjukkan rerata diameter yang tidak signifikan dengan hasil signifikansi sebesar 0.767 ( $p < 0.05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa seiring dengan berjalannya waktu, rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* semakin menurun secara signifikan.

#### 5.2.4 Uji *Post Hoc Tukey Test* Hari ke-10 setelah Revival

Uji *Post Hoc Tukey Test* juga dilakukan pada data yang diambil pada hari ke-10 setelah revival untuk dapat mengetahui perbandingan rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* antar revival pada data yang diukur pada hari ke-10 setelah dalam periode 1 tahun yang dapat dilihat pada tabel 5.5 berikut.

Tabel 5.5 Hasil *Post Hoc Tukey Test* pada hari ke-10 setelah *revival*

HARI 10	Revival 1	Revival 2	Revival 3	Revival 4	Revival 5	Revival 6	Revival 7
Revival 1							
Revival 2	1.000						
Revival 3	0.131	0.131					
Revival 4	0.317	0.317	0.508				
Revival 5	0.047	0.047	0.139	0.091			
Revival 6	0.047	0.047	0.237	0.166	0.468		
Revival 7	0.013	0.013	0.041	0.037	0.772	0.554	

Hasil dari data *Post Hoc Tukey Test* pada hari ke-10 setelah *revival* adalah sebagai berikut:

- Terdapat perbedaan yang tidak signifikan pada data hari ke-10 setelah *revival*, antara *revival 1* dan 2, antara *revival 1* dan 3, antara *revival 1* dan 4, antara *revival 2* dan 3, antara *revival 2* dan 4, antara *revival 3* dan 4, antara *revival 3* dan 5, antara *revival 3* dan 6, antara *revival 4* dan 5, antara *revival 4* dan 6, antara *revival 5* dan 6, serta antara *revival 5* dan 7, serta antara *revival 6* dan 7.
- Terdapat perbedaan yang signifikan pada data hari ke-10 setelah *revival*, antara *revival 1* dan 5, antara *revival 1* dan 6, antara *revival 1* dan 7, antara *revival 2* dan 5, antara *revival 2* dan 6, antara *revival 2* dan 7, antara *revival 3* dan 7, serta antara *revival 4* dan 7.

Berdasarkan data uji *Post Hoc Tukey Test* dengan data di hari ke-10 setelah *revival*, pertumbuhan *Aspergillus niger* pada *revival* pertama



dibandingkan dengan rerata diameter pada *revival* terakhir (*revival* 7), hasilnya menunjukkan perbandingan yang signifikan dengan signifikansi sebesar 0.013 ( $p < 0.05$ ). Tetapi, rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada *revival* pertama dibandingkan dengan *revival* kedua menunjukkan hasil yang tidak signifikan dengan hasil signifikansi sebesar 1.000 ( $p < 0.05$ ). Data ini menunjukkan bahwa seiring dengan berjalannya waktu preservasi, pertumbuhan rerata diamer *Aspergillus niger* mengalami penurunan selama periode 1 tahun.

### 5.3 Identifikasi *Aspergillus niger* dengan LPCB

Identifikasi *Aspergillus niger* dilakukan dengan menggunakan metode LPCB (*Lactophenol Cotton Blue*) yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hasil dari pewarnaan LPCB *Aspergillus niger* pada penelitian ini didapatkan seperti pada gambar 5.15 berikut.



**Gambar 5.15** Hasil Identifikasi *Aspergillus niger* dengan LPCB. Didapatkan gambaran konidiofor panjang dan kumpulan fialid dan metula

## BAB 6

## PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas *Aspergillus niger* di hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival* selama periode 1 tahun penyimpanan pada suhu 4°C dengan pemberian gliserol 10% secara *in vitro*. Metode dalam penelitian ini adalah pengukuran rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* pada SDA yang diamati fenotipnya secara makroskopis. Metode ini digunakan untuk mengetahui efek preservasi gliserol 10% pada suhu 4°C terhadap rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* yang diukur pada hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival* selama periode 1 tahun.

Pertumbuhan *Aspergillus niger* dilakukan pada media SDA karena SDA memiliki pH asam untuk tempat tumbuhnya jamur berfilamen seperti *Aspergillus niger* dan SDA juga memiliki kasein yang dicerna secara enzimatik dan jaringan hewan yang menjadi sumber nutrisi asam amino untuk pertumbuhan jamur (Rijal, 2015). Preservasi jamur dalam jangka panjang akan merusak karakteristik fisiologis dan molekulernya sehingga gliserol 10% bekerja sebagai *cryoprotectant* untuk menjaga aktivitas regenerasi sel dan mencegah kerusakan jamur selama masa preservasi (Paul *et al*, 2015). Kulkas bersuhu 4°C digunakan untuk menyimpan stok *Aspergillus niger* selama masa preservasi 1 tahun karena mudah didapat dan biayanya yang terjangkau (Paul *et al*, 2015).

Dengan dilakukannya preservasi *Aspergillus niger* di suhu 4°C dengan pemberian gliserol 10% sebagai *cryoprotectant*, hasil rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* di hari ke-5 dan hari ke-10 setelah mengalami 7 kali *revival* selama periode 1 tahun dapat disimpulkan bahwa

seiring dengan lamanya waktu preservasi (1 tahun), rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* mengalami penurunan dengan pengecualian terdapat peningkatan pertumbuhan di *revival* terakhir (*revival* ketujuh). Pengecualian ini dapat disebabkan karena pemberian inokulasi lempeng *Aspergillus niger* pada tengah-tengah SDA *plate* yang diambil dari *cryotube* berpotensi untuk mengandung kadar *Aspergillus niger* yang berbeda-beda pada setiap *revival*. Namun, meskipun rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* mengalami penurunan seiring dengan berjalannya waktu, pertumbuhan di hari ke-10 setelah *revival* selalu mengalami kenaikan apabila dibandingkan dengan pertumbuhannya yang diukur pada hari ke-5 setelah *revival*.

Berdasarkan hasil data uji statistik dengan tingkat nilai keakuratan yang tinggi, dapat disimpulkan bahwa pada penelitian ini, *Aspergillus niger* tetap *viable* dalam preservasi nya selama 1 tahun di suhu 4°C menggunakan gliserol 10% dengan hasil pertumbuhan selama 1 tahun mengalami penurunan secara signifikan menurut Uji *Post Hoc Tukey Test*. Namun, tidak ada perbedaan yang signifikan pada rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* antara hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival* selama 1 tahun menurut Uji *Mann Whitney U Test*.

Penelitian lain juga dilakukan oleh Andrew M. Borman *et al* yang meneliti tentang evaluasi viabilitas jamur berfilamen yang patogenik setelah penyimpanan dengan menggunakan teknik preservasi *sterile water*. Kultur setelah dilakukan *revival* dilihat secara mikroskopis bagaimana konidiogenesisnya dan juga dilihat secara makroskopis apakah kultur jamur tetap dapat mempertahankan morfologi tipikal dari koloninya. Hasil dari penelitian Borman ini menemukan bahwa 10% dari semua kultur mengalami perubahan makros dan mikros secara signifikan, dimana terjadi proliferasi dari produksi *sterile mycelium* dengan penurunan

konidiogenesis. Salah satu contohnya adalah isolat dermatofit (*Trichophyton interdigitale* dan *Microsporum canis*) mengalami produksi gambaran kapas atau *floccose aerial mycelium* yang berlebihan dengan penurunan konidiogenesis serta hilangnya karakteristik pewarnaan koloni (Borman *et al*, 2006).

Penelitian yang dilakukan oleh Andrew M. Borman *et al* ini juga meneliti beberapa isolat *Aspergillus spp.* yang juga disimpan dengan teknik preservasi *sterile water*. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa *Aspergillus spp.* tersebut mengalami kehilangan sporulasi dan perubahan pewarnaan koloni. Meskipun mereka juga tidak punya penjelasan yang kuat mengapa terjadi perubahan tersebut, kemungkinan penyebabnya adalah karena kondisi dan usia dari inokulum yang dipakai dalam preservasi dapat berkontribusi pada variabilitas hasil setelah *revival*. Andrew M. Borman *et al* juga menyimpulkan bahwa viabilitas isolat dapat bergantung pada karakteristik organisme atau isolat yang dipakai, dan juga dapat bergantung pada kualitas dari inokulumnya. Mereka menulis bahwa terjadinya transfer antar media pertumbuhan dan organisme yang disimpan saat dilakukan *revival* dapat menimbulkan keterbatasan pertumbuhan dan mutasi isolat selama masa penyimpanan (Borman *et al*, 2006).

Suatu jurnal oleh Teertstra *et al* menulis bahwa maturasi dari konidiofor *Aspergillus niger* disertai dengan perbedaan RNA dan komposisi zat terlarut yang kompatibel, kemampuan mengekstrak melanin, efisiensi penyebaran air dan tingkat kemampuan untuk melakukan germinasi jamur (Teertstra *et al*, 2017), Romsdahl *et al* juga menulis bahwa konidia *Aspergillus niger* memiliki dinding sel tebal yang terbentuk dari kumpulan karbohidrat, termasuk  $\beta$ -glucans, *chitin*,  $\alpha$ -glucans, *galactomannan* dan *galactosaminogalactan*, dengan lapisan luar dinding sel yang mengandung pigmen melanin kompleks. Romsdahl menulis

bahwa protein alba adalah salah satu enzim kunci biosintesis yang berperan dalam produksi melanin *Aspergillus niger*. Isolat *Aspergillus niger* yang memiliki karakteristik konidia berwarna hitam berubah menjadi berwarna putih (*colourless conidial phenotype*) karena adanya mutasi dari protein alba *Aspergillus niger*. Selain mutasi dari protein alba, Romsdahl juga menulis bahwa jamur yang berada pada lingkungan dengan radiasi tinggi dapat meningkatkan produksi melanin (Romsdahl *et al*, 2018).

Penelitian lainnya mengenai preservasi jamur pada suhu 4°C pernah dilakukan sebelumnya oleh Jai Shankar Paul *et al*, tetapi dengan konsentrasi gliserol dan metode yang berbeda. Penelitian tersebut menggunakan metode *slant culture* dan *slice cut* dengan konsentrasi gliserol 5%, 15% dan 50%. Pada penelitian tersebut, seluruh jamur, termasuk *Aspergillus niger*, yang dipreservasikan menggunakan gliserol 5% tetap *viable* selama 18 bulan pada kedua metode dan pada gliserol 50%, seluruh jamur, salah satunya adalah *Aspergillus niger*, tetap *viable* setelah preservasi selama 24 bulan (Paul *et al*, 2015). Meskipun menggunakan konsentrasi yang berbeda, dapat disimpulkan bahwa preservasi dengan menggunakan gliserol sebagai *cryoprotectant* dapat menjaga viabilitas *Aspergillus niger* seperti pada penelitian ini yang menggunakan gliserol 10% selama 12 bulan.

Bersamaan dengan penelitian yang dilakukan oleh Jai Shankar Paul *et al*, telah dilakukan penelitian oleh Brancato dan Golding yang menggunakan diameter sebagai ukuran pertumbuhan koloni jamur saat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, kelembaban dan pH media pertumbuhan. Hasil dari penelitian ini adalah *Aspergillus niger* mulai tumbuh pada suhu 20°C dan optimal pada suhu 30-35°C dengan diameter (mm) yang juga turut mengalami

kenaikan seiring dengan kenaikan suhu. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan isolat dengan suhu yang mendekati dengan suhu optimal pertumbuhan *Aspergillus niger*, seperti pada penelitian ini yaitu isolat *Aspergillus niger* yang ditumbuhkan pada SDA *plate* dan diletakkan di inkubator bersuhu 37°C untuk proses *thawing*, tetap dapat menumbuhkan *Aspergillus niger* dengan baik. Penelitian lain juga dilakukan oleh Fitriana *et al* untuk melihat pengaruh media pertumbuhan SDA, PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan CMA (*Corn Meal Agar*) pada viabilitas spora *Aspergillus spp.* Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa viabilitas spora *Aspergillus spp.* tidak dipengaruhi oleh perbedaan media pertumbuhan dengan data pertumbuhan 95.10 - 97.66% pada PDA, 94.02 - 98.54% pada SDA dan 92.86 - 98.20% pada CMA. Hal ini menunjukkan bahwa SDA dapat menjadi media pertumbuhan *Aspergillus niger* yang baik (Fitriani *et al*, 2018).

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak ada penelitian pendahuluan untuk mengetahui bagaimana pertumbuhan *Aspergillus niger* setelah dilakukannya *revival* dengan teknik preservasi menggunakan *cryoprotectant*. Lama penyimpanan dari *Aspergillus niger* dengan menggunakan konsentrasi gliserol dan suhu yang berbeda juga dapat mengakibatkan perbedaan diameter pertumbuhan dan viabilitas dari *Aspergillus niger* tersebut.

Keterbatasan lainnya dari penelitian ini adalah keterbatasan listrik tanpa adanya genset di laboratorium tempat dilakukannya penelitian ini sehingga kulkas dan inkubator sempat mati. Penelitian-penelitian selanjutnya diharapkan ada standardisasi baik pemilihan konsentrasi gliserol, suhu, lama penyimpanan isolat, dan penentuan pengukuran pertumbuhan *Aspergillus niger* dilakukan pada

hari ke berapa. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi pedoman bagi penelitian lain tentang preservasi *Aspergillus niger* di masa depan.



## BAB 7

## PENUTUP

## 7.1 Kesimpulan

- a) *Aspergillus niger* tetap *viabile* setelah menjalani preservasi selama periode 1 tahun dengan menggunakan gliserol 10% pada suhu 4°C secara *in vitro* yang dapat dilihat dari data rerata diameter pertumbuhannya pada hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival*, sehingga hipotesis dari penelitian ini dinyatakan terbukti.
- b) Seiring dengan lamanya waktu penyimpanan isolat *Aspergillus niger*, rerata diameter pertumbuhannya semakin menurun. Tetapi, rerata diameter pertumbuhan *Aspergillus niger* tidak mengalami perbedaan yang signifikan antara pertumbuhan pada hari ke-5 dan hari ke-10 setelah *revival* selama periode 1 tahun.

## 7.2 Saran

- a) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang preservasi *Aspergillus niger* dan bagaimana viabilitasnya selama masa penyimpanan tersebut.
- b) Perlu dilakukan efek preservasi *Aspergillus niger* dengan menggunakan media lain selain SDA untuk mengetahui pertumbuhannya pada media dengan kandungan nutrisi yang berbeda dari SDA.
- c) Perlu dilakukan penelitian lain dengan menggunakan konsentrasi gliserol dan suhu penyimpanan *Aspergillus niger* yang berbeda untuk dapat mengetahui konsentrasi dan suhu yang efektif untuk menyimpan *Aspergillus niger* dengan viabilitas yang baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alonso, S., 2016. Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures. In *Novel Food Fermentation Technologies* (pp. 7-33). Springer, Cham.
- American Type Culture Collection (ATCC). 2011. 'Preservation and Recovery of Filamentous Fungi', *The Essentials of Life science Research*, pp. 1–4. Available at: [www.atcc.org](http://www.atcc.org).
- Aspergillus & Aspergillosis Website. 2009. Aspergillus Otomycosis. Diakses dari <https://www.aspergillus.org.uk/content/aspergillus-otomycosis> pada Oktober 2019.
- Bhattacharya, S., 2018. Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. In *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. IntechOpen.
- Biyık, H.H., Törün, B., Geroğlu, Y., Çoban, E.P. and Başbülbül, G., 2016. Preservation and Molecular Identification of Aspergillus and Penicilium Species with ITS-PCR. *Preservation*, 4(11).
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R.O. and Denning, D.W., 2017. Global and Multi-national Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of fungi*, 3(4), p.57.
- Borman, A.M., Szekely, A., Campbell, C.K. and Johnson, E.M., 2006. Evaluation of the Viability of Pathogenic Filamentous Fungi after Prolonged Storage in Sterile Water and Review of Recent Published Studies on Storage Methods. *Mycopathologia*, 161(6), pp.361-368.
- Brancato, F.P. and Golding, N.S., 1953. The Diameter of The Mold Colony as A Reliable Measure of Growth. *Mycologia*, 45(6), pp.848-864.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G. and White, T.C., 2012. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science translational medicine*, 4(165), pp.165rv13-165rv13.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. Fungal Diseases: Aspergillosis.

<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/index.html> Diakses tanggal 11 November 2018

Crampton, L. 2017. Penicillin, Lovastatin, and Cyclosporine: Medicines From Fungi.

<https://owlcation.com/stem/Medications-From-Molds-Fungi-and-Health> Diakses tanggal 1 Desember 2018

d'Halewyn, M.A. and Chevalier, P., 2014. *Aspergillus niger*, Guy St-germain, B. Sc. *Microbiology*.

Doelle, H. W. 2013. Maintenance and Preservation of Microbial Cultures. *Microbial Process Development*, 55–74. [https://doi.org/10.1142/9789814440929\\_0005](https://doi.org/10.1142/9789814440929_0005)

FAO. 2012. Cryoconservation of Animal Genetic Resources. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. Rome.

Fitriana, Y., Suharjo, R., Swibawa, I.G., Purnomo, P., Lestari, P. and Merdiana, E., 2018. Influence of Culture Medium on the Sporulation and Viability of *Aspergillus* Spp. and *Talaromyces* Spp. Entomopathogenic Fungi. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 18(1), pp.12-22.

Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J. and Barer, M., 2007. Medical Microbiology A Guide to Microbial Infections. *Churchill Livingstone, Edinburgh*.

Harman, E. 2019. Aspergillosis. <https://emedicine.medscape.com/article/296052-overview#a5>. Diakses tanggal 11 November 2018

Homolka, L., Lisá, L. and Nerud, F., 2006. Basidiomycete Cryopreservation on Perlite: Evaluation of A New Method. *Cryobiology*, 52(3), pp.446-453.

Kavanagh, K. T. 2017. External Ear Canal. ENT USA. [http://www.entusa.com/external\\_ear\\_canal.htm](http://www.entusa.com/external_ear_canal.htm). Diakses tanggal 14 November 2018

Kibbler, C.C., Barton, R., Gow, N.A., Howell, S., MacCallum, D.M. and Manuel, R.J. eds., 2017. *Oxford Textbook of Medical Mycology*. Oxford University Press.

- Kidd, S., Halliday, C.L., Alexiou, H. and Ellis, D.H., 2016. *Descriptions of Medical fungi*. David Ellis.
- Kliasova, G.A., Petrova, N.A., Galstian, G.M., Gotman, L.N., Vishnevskaiia, E.S., Sysoeva, E.P., Khoroshko, N.D., Mikhaïlova, E.A., Parovichnikova, E.N. and Isaev, V.G., 2003. Invasive Aspergillosis in Immunocompromised Patients. *Terapevticheskii arkhiv*, 75(7), pp.63-68.
- Lalaymia, I., Cranenbrouck, S. and Declerck, S., 2014. Maintenance and Preservation of Ectomycorrhizal and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mycorrhiza*, 24(5), pp.323-337.
- Miyashira, C.H., Tanigushi, D.G., Gugliotta, A.M. and Santos, D.Y.A.C., 2010. Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* forel in two culture media. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), pp.506-511.
- Nakasone, K.K., Peterson, S.W. and Jong, S.C., 2004. Preservation and Distribution of Fungal Cultures. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004: Pages 37-47., 3.
- Patterson, T.F. and McGinnis, M.R., 2009. The Fungi: Description. Site Doctor Fungus. *Mycoses Study Group*.
- Paul, J.S., Tiwari, K.L. and Jadhav, S.K., 2015. Long Term Preservation of Commercial Important Fungi in Glycerol at 4 C. *Int J Biol Chem*, 9(2), pp.79-85.
- Prasad, S.C., Kotigadde, S., Shekhar, M., Thada, N.D., Prabhu, P., D'Souza, T. and Prasad, K.C., 2014. Primary Otomycosis in The Indian Subcontinent: Predisposing Factors, Microbiology, and Classification. *International Journal of Microbiology*, 2014.
- Rijal, N. 2015. Sabouraud Dextrose Agar (SDA): Principle, Composition, Uses and Colony Morphology. <https://microbeonline.com/sabouraud-dextrose-agar-sda-principle-composition-uses-colony-morphology/> Diakses tanggal 14 Oktober 2018.

Romsdahl, J., Blachowicz, A., Chiang, A.J., Singh, N., Stajich, J.E., Kalkum, M., Venkateswaran, K. and Wang, C.C., 2018. Characterization of *Aspergillus niger* Isolated from the International Space Station. *MSystems*, 3(5), pp.e00112-18.

Rosenthal, K.S. and Pfaller, M.A., 2008. Medical Microbiology. *Murray PR, 6th Ed., ABD: Mosby Elsevier*.

Sturt, A. and Aberg, J. A. 2006. Aspergillosis and HIV. HIV InSite Knowledge Base Chapter. Diakses dari <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-05-02-02> pada tanggal 14 November 2018

Teertstra, W.R., Tegelaar, M., Dijksterhuis, J., Golovina, E.A., Ohm, R.A. and Wösten, H.A., 2017. Maturation of conidia on conidiophores of *Aspergillus niger*. *Fungal genetics and biology*, 98, pp.61-70.



**Lampiran 2. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas**

**Uji Normalitas *Shapiro-Wilk Test***

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Hari	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Diameter	Hari-5	.231	7	.200 <sup>*</sup>	.916	7	.438
	Hari-10	.176	7	.200 <sup>*</sup>	.907	7	.377

**Uji Homogenitas *Levene Homogeneity of Variance Test***

Independent Samples Test			
Levene's Test for Equality of Variances			
		F	Sig.
Diameter	Equal variances assumed	5.426	.038
	Equal variances not assumed		
	assumed		

**Lampiran 3. *Mann Whitney U Test***

Hypothesis Test Summary			
	Null Hypothesis	Test	Decision
1	The distribution of Diameter is the same across categories of Hari.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.053 <sup>1</sup> Retain the null hypothesis.



Lampiran 4. Post Hoc Tukey Test Hari ke-5 setelah Revival

Antar Revival 1 dan 2

		Ranks			
		Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-1		4	4.25	17.00
	Revival-2		4	4.75	19.00
	Total		8		

Test Statistics<sup>a</sup>

		DiameterH5
Mann-Whitney U		7.000
Wilcoxon W		17.000
Z		-.296
Asymp. Sig. (2-tailed)		.767
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.896 <sup>b</sup>

Antar Revival 1 dan 3



		Ranks			
		Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-1		4	4.00	16.00
	Revival-3		4	5.00	20.00
	Total		8		

Test Statistics<sup>a</sup>

		DiameterH5
Mann-Whitney U		6.000
Wilcoxon W		16.000
Z		-.592
Asymp. Sig. (2-tailed)		.554
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.686 <sup>b</sup>



Antar Revival 1 dan 4

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-1	4	6.50	26.00
	Revival-4	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
DiameterH5	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

Antar Revival 1 dan 5



Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-1	4	6.00	24.00
	Revival-5	4	3.00	12.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
DiameterH5	
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

Antar Revival 1 dan 6

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-1	4	6.50	26.00
	Revival-6	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

Antar Revival 1 dan 7

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-1	4	6.50	26.00
	Revival-7	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>



Antar Revival 2 dan 3

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-2	4	4.25	17.00
	Revival-3	4	4.75	19.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-.308
Asymp. Sig. (2-tailed)	.758
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 <sup>b</sup>

Antar Revival 2 dan 4

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-2	4	6.25	25.00
	Revival-4	4	2.75	11.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.033
Asymp. Sig. (2-tailed)	.042
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>b</sup>



Antar Revival 2 dan 5

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-2	4	6.00	24.00
	Revival-5	4	3.00	12.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.742
Asymp. Sig. (2-tailed)	.081
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

Antar Revival 2 dan 6



Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-2	4	6.50	26.00
	Revival-6	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>



Antar Revival 2 dan 7

**Ranks**

	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-2	4	6.25	25.00
	Revival-7	4	2.75	11.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	DiameterH5
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.033
Asymp. Sig. (2-tailed)	.042
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>b</sup>

Antar Revival 3 dan 4

**Ranks**

	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-3	4	6.50	26.00
	Revival-4	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	DiameterH5
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>



Antar Revival 3 dan 5

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-3	4	6.25	25.00
	Revival-5	4	2.75	11.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.033
Asymp. Sig. (2-tailed)	.042
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>b</sup>

Antar Revival 3 dan 6



Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-3	4	6.50	26.00
	Revival-6	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

Antar Revival 3 dan 7

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-3	4	6.50	26.00
	Revival-7	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

Antar Revival 4 dan 5



Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-4	4	5.25	21.00
	Revival-5	4	3.75	15.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 <sup>b</sup>

Antar Revival 4 dan 6

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-4	4	6.50	26.00
	Revival-6	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

Antar Revival 4 dan 7



Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-4	4	5.25	21.00
	Revival-7	4	3.75	15.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 <sup>b</sup>



Antar Revival 5 dan 6

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-5	4	5.00	20.00
	Revival-6	4	4.00	16.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	DiameterH5
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-.577
Asymp. Sig. (2-tailed)	.564
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>b</sup>

Antar Revival 5 dan 7

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-5	4	4.25	17.00
	Revival-7	4	4.75	19.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	DiameterH5
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-.289
Asymp. Sig. (2-tailed)	.773
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 <sup>b</sup>



Antar Revival 6 dan 7

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH5	Revival-6	4	2.75	11.00
	Revival-7	4	6.25	25.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH5	
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.021
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>b</sup>

Lampiran 5. *Post Hoc Tukey Test* Hari ke-10 setelah Revival

Antar Revival 1 dan 2

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-1	4	4.50	18.00
	Revival-2	4	4.50	18.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>b</sup>



Antar Revival 1 dan 3

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-1	4	5.50	22.00
	Revival-3	4	3.50	14.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.512
Asymp. Sig. (2-tailed)	.131
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>

Antar Revival 1 dan 4

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-1	4	5.00	20.00
	Revival-4	4	4.00	16.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>b</sup>



Antar Revival 1 dan 5

**Ranks**

	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-1	4	6.00	24.00
	Revival-5	4	3.00	12.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	DiameterH10
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

Antar Revival 1 dan 6

**Ranks**

	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-1	4	6.00	24.00
	Revival-6	4	3.00	12.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	DiameterH10
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>



Antar Revival 1 dan 7

**Ranks**

	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-1	4	6.50	26.00
	Revival-7	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.477
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

Antar Revival 2 dan 3

**Ranks**

	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-2	4	5.50	22.00
	Revival-3	4	3.50	14.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.512
Asymp. Sig. (2-tailed)	.131
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>



Antar Revival 2 dan 4

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-2	4	5.00	20.00
	Revival-4	4	4.00	16.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>b</sup>

Antar Revival 2 dan 5

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-2	4	6.00	24.00
	Revival-5	4	3.00	12.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>



Antar Revival 2 dan 6

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-2	4	6.00	24.00
	Revival-6	4	3.00	12.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

Antar Revival 2 dan 7

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-2	4	6.50	26.00
	Revival-7	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.477
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>



Antar Revival 3 dan 4

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-3	4	4.00	16.00
	Revival-4	4	5.00	20.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-.661
Asymp. Sig. (2-tailed)	.508
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>b</sup>

Antar Revival 3 dan 5

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-3	4	5.75	23.00
	Revival-5	4	3.25	13.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.479
Asymp. Sig. (2-tailed)	.139
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 <sup>b</sup>



Antar Revival 3 dan 6

**Ranks**

Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10			
Revival-3	4	5.50	22.00
Revival-6	4	3.50	14.00
Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.183
Asymp. Sig. (2-tailed)	.237
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>

Antar Revival 3 dan 7

**Ranks**

Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10			
Revival-3	4	6.25	25.00
Revival-7	4	2.75	11.00
Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.045
Asymp. Sig. (2-tailed)	.041
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>b</sup>



Antar Revival 4 dan 5

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-4	4	5.88	23.50
	Revival-5	4	3.13	12.50
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	12.500
Z	-1.692
Asymp. Sig. (2-tailed)	.091
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

Antar Revival 4 dan 6



Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-4	4	5.63	22.50
	Revival-6	4	3.38	13.50
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	13.500
Z	-1.384
Asymp. Sig. (2-tailed)	.166
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 <sup>b</sup>

Antar Revival 4 dan 7

**Ranks**

	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-4	4	6.25	25.00
	Revival-7	4	2.75	11.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	DiameterH10
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.084
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>b</sup>

Antar Revival 5 dan 6

**Ranks**

	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-5	4	3.88	15.50
	Revival-6	4	5.13	20.50
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	DiameterH10
Mann-Whitney U	5.500
Wilcoxon W	15.500
Z	-.726
Asymp. Sig. (2-tailed)	.468
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 <sup>b</sup>



Antar Revival 5 dan 7

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-5	4	4.25	17.00
	Revival-7	4	4.75	19.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-.290
Asymp. Sig. (2-tailed)	.772
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 <sup>b</sup>

Antar Revival 6 dan 7

Ranks				
	Revival	N	Mean Rank	Sum of Ranks
DiameterH10	Revival-6	4	5.00	20.00
	Revival-7	4	4.00	16.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

DiameterH10	
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-.592
Asymp. Sig. (2-tailed)	.554
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>b</sup>

