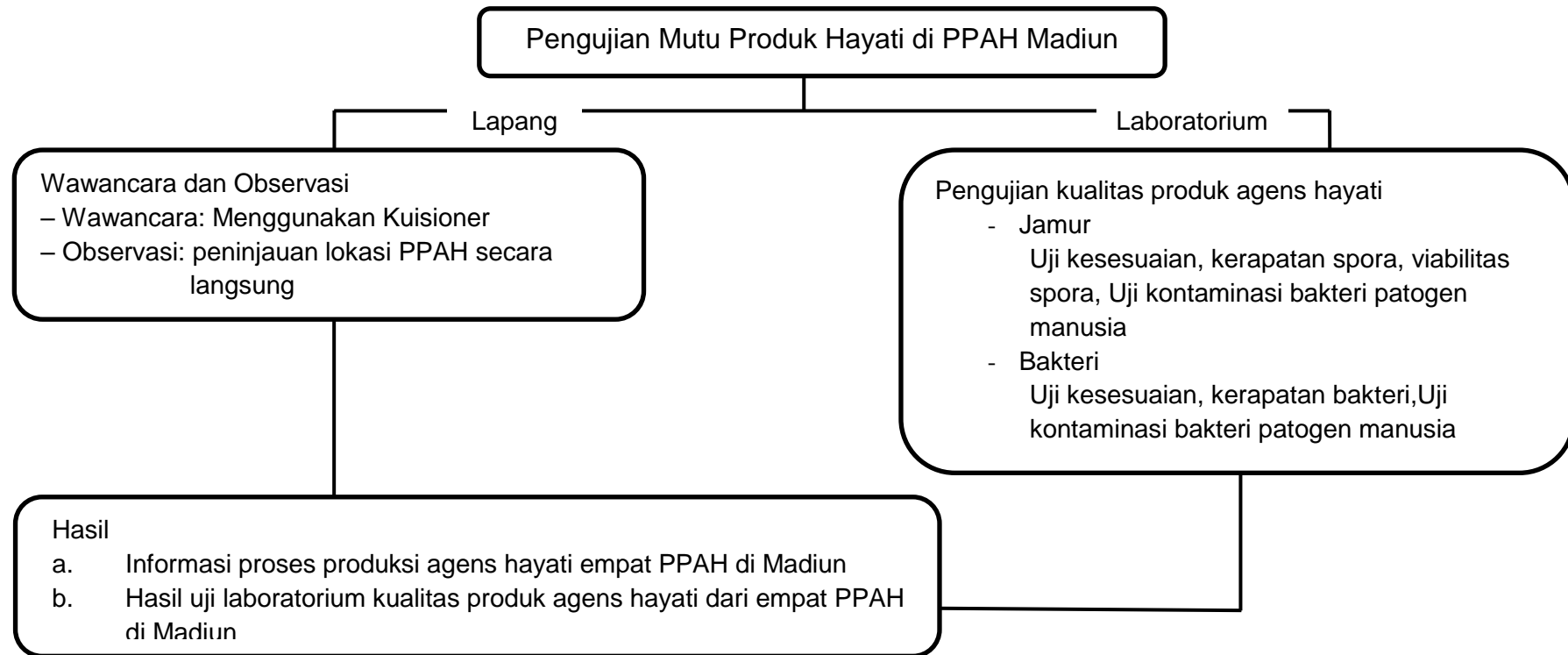


III. METODE PELAKSANAAN

3.1 Kerangka Penelitian

Pelaksanaan penelitian digambarkan dalam kerangka penelitian (Gambar 9) yang dapat memudahkan untuk memahami alur penelitian.



Gambar 9. Kerangka Penelitian

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di empat PPAH binaan LPHTPH Madiun, yaitu PPAH Mekar Sari Kecamatan Dagangan Kabupaten Madiun, PPAH Alam Lestari Kecamatan Sukorejo Kabupaten Ponorogo, PPAH Mitra Tani Kecamatan Mlarak Kabupaten Ponorogo, dan PPAH Hidup Lestari Kecamatan Nguntoronadi Kabupaten Magetan. Pemilihan PPAH didasarkan pada rekomendasi dari LPHP Madiun yang terdata masih aktif. Pelaksanaan uji mutu produk agens hayati dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Hayati dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada Bulan Juni sampai September 2017.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, mikropipet, pipet ukur 10 ml, *Erlenmeyer* 250 ml, cawan petri, *cover glass*, *object glass*, mikroskop, *Haemocytometer*, oven, autoklaf, LAFC, *hand counter*, tabung reaksi, gelas ukur 100 ml, botol putih 100 ml, kompor, tisu, plastik *wrapping*, *aluminium foil*, plastik tahan panas, bunsen, kertas label, dan kamera. Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah, produk agens hayati dari PPAH, akuades, spirtus, kentang, kloramfenikol, dextrose, pepton, NA, alkohol.

3.4 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk dalam penelitian kualitatif, yaitu dengan cara observasi dan wawancara secara langsung pada responden yang telah ditentukan. Penelitian kualitatif merupakan suatu prosedur penelitian yang menghasilkan data deskriptif seperti ucapan atau tulisan dari responden. Pendekatan secara kualitatif digunakan untuk menemukan dan memahami permasalahan yang sulit untuk diketahui asal mulanya (Rahmat, 2009).

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Pengujian Mutu Produk Agens Hayati

Pemelitian dilakukan dengan kegiatan wawancara, observasi dan pengujian terhadap hasil produk agens hayati PPAH Madiun.

Pemilihan Responden dilakukan dengan menggunakan metode *purposive sampling*, sampel yang dipilih ditentukan secara sistematis atau sengaja (Dwiastuti, 2012). Responden yang dipilih yaitu Ketua dan bagian pelaksana produksi di PPAH.

Wawancara dilakukan untuk mendapatkan informasi yang terkait dengan penelitian. Informasi mengenai kegiatan produksi sampai pada distribusi oleh

PPAH, Wawancara dilakukan dengan memberikan pertanyaan pada responden dalam bentuk kuisioner (Lampiran 1).

Observasi dilakukan dengan pengamatan secara langsung kondisi laboratorium mini dan penyimpanan produk agens hayati di PPAH. Hasil observasi dilakukan penilaian menggunakan indikator yang telah ditentukan (Lampiran 2 dan 3).

3.5.2 Pengujian Mutu Produk Agens Hayati

Pengujian produk agens hayati dilakukan untuk mengetahui mutu produk agens hayati yang dihasilkan oleh PPAH di Madiun. Pengujian mutu produk agens hayati melalui tahapan seperti uji kesesuaian produk, perhitungan kerapatan dan viabilitas mikroba, serta melakukan uji kontaminasi bakteri patogen manusia.

Pengambilan Sampel Agens Hayati

Sampel produk agens hayati diambil dari masing-masing PPAH yang telah ditentukan. Sampel yang diambil adalah sebanyak 10% dari sampel keseluruhan ketika produksi atau arsip. Sampel yang sudah diperoleh dimasukkan dalam botol putih steril berukuran 100 ml, kemudian ditutup rapat dengan penutup botol yang telah dilapisi *aluminium foil*. Sampel produk agens hayati disimpan pada ruangan yang kering dalam kurun waktu dua minggu sampai pada tahap pengujian.

Pengujian Mutu Sampel Produk Agens Hayati di Laboratorium

1. Pengujian Mutu Jamur

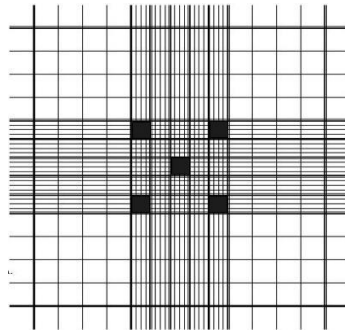
a. Uji Kesesuaian Kandungan Produk Agens Hayati dengan Label Kemasan

Pengujian dilakukan dengan cara mengamati kenampakan makroskopis dan mikroskopis mikroorganisme. Pengamatan kenampakan makroskopis dilakukan dengan menumbuhkan sampel produk agens hayati pada media PDA untuk mengetahui miselium yang tumbuh. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan melihat bentuk spora pada mikroskop dilakukan bersamaan dengan pengujian viabilitas. Hasil pengamatan kenampakan makroskopis dan mikroskopis dibandingkan dengan buku *Pictorial Atlas of Spore and Seed Fungi* (Watanabe, 2002) dan *Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Fourth Edition* (Barnett, H.L dan B.B Hunter, 1998).

b. Kerapatan Spora Jamur

Produk agens hayati yang diperoleh dihomogenkan. Pengenceran sampel produk agens hayati dilakukan jika konidia yang diamati terlalu rapat saat

perhitungan. Suspensi diambil sebanyak 100 mikroliter menggunakan mikropipet dan diteteskan pada bidang hitung *haemocytometer* yang telah diutup dengan *cover glass* (Herlinda *et al.*, 2006). Sampel diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x (Herlinda *et al.*, 2006). Perhitungan konidia dilakukan pada dua bidang hitung yang berada di dalam kotak hitung. Konidia yang tepat berada pada garis batas kotak hitung, maka konidia yang berada di sisi kiri dan atas kotak dihitung (Nasir, 2014).



Gambar 10. Bidang Pandang *Haemocytometer* (Hoffman, 2006)

Perhitungan kerapatan konidia dapat dilakukan pada setiap bidang hitung menggunakan rumus Syaifuddin (1992) dalam Khairani (2007), hasil dari perhitungan setiap bidang hitung kemudian direrata, dan dihitung dengan rumus perhitungan :

$$C = \frac{t \times d}{0,25 \times n} \times 10^6$$

C merupakan kerapatan spora per ml larutan, **t** ialah jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati, **d** ialah faktor pengenceran yang dilakukan, **n** ialah jumlah kotak sampel (5 kotak besar x 16 kotak kecil), dan 0.25 ialah faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada *Haemocytometer*.

c. Viabilitas Spora Jamur

Sampel yang diuji dihomogenkan dan menyiapkan media Ekstrak Kentang Gula (EKG) untuk inkubasi produk yang diuji. Sebanyak 0,5 ml media EKG diteteskan pada *object glass* yang telah steril. Kemudian ditambahkan sampel produk kurang lebih 0,5 ml di atas *object glass* dan ditutup menggunakan *cover glass* (Surtikanti *et al.*, 2016). Dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Cawan petri berisi tisu yang telah dilembabkan dengan akuades disiapkan sebagai inkubator *object glass* dan ditutup. Inkubasi dilakukan selama dua kali 24 jam pada suhu

kamar (Surtikanti *et al.*, 2016). *Object glass* yang telah diinkubasi diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x. Jumlah konidia yang telah berkecambah dan tidak berkecambah dapat dihitung menggunakan rumus Gabriel dan Riyanto (1989):

$$V = \frac{g}{g + u} \times 100\%$$

V merupakan, perkecambahan spora, **g** ialah jumlah spora yang berkecambah, dan **u** ialah jumlah spora yang tidak berkecambah.

Pengamatan viabilitas dilakukan pada perbesaran 400x dengan mengamati konida berkecambah yang bercirikan tabung kecambah memiliki panjang dua kali dari diameter spora (Herlinda, 2010). Pengamatan dan perhitungan jumlah konidia yang telah berkecambah diulang pada *object glass* ke-2 dan 3. Kemudian menghitung hasil rata-rata dari ketiga preparat tersebut.

2. Pengujian Mutu Bakteri

A. Uji Kesesuaian Kandungan Produk Agens Hayati dengan Label Kemasan

Pengujian kesesuaian produk dengan label kemasan bertujuan untuk memastikan jenis bakteri yang ada di dalam produk agens hayati. Pengujian dilakukan dengan cara identifikasi bakteri untuk mengetahui tingkat genus. Beberapa cara yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri hingga tingkat genus ialah:

a.) Pertumbuhan pada Media Selektif

Sampel bakteri produk agens hayati ditumbuhkan pada media selektif bertujuan untuk mengetahui koloni bakteri yang muncul. Bakteri *P. fluorescens* dapat hidup pada media selektif King's B, media selektif YMEA (*Yeast Malt Extract Agar*) untuk pertumbuhan bakteri berupa *Corynebacterium* sp. Penanaman bakteri pada media selektif dilakukan dengan pengenceran bertingkat terlebih dahulu. Pengenceran bertingkat dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan substrat sehingga ketika bakteri ditanam pada sebuah media akan timbul bakteri yang murni. Penanaman bakteri menggunakan pengenceran 10^7 . Penanaman bakteri yang telah diencerkan dilakukan menggunakan metode *spread plate*. Setelah ditanam pada media selektif, bakteri di inkubasi selama 24 – 48 jam dan kemudian diamati koloni yang tumbuh pada media selektif dan dilanjutkan untuk uji selanjutnya.

b.) Uji di bawah sinar ultraviolet (UV)

Bakteri *P. fluorescens* yang tumbuh di media selektif King's B diuji menggunakan sinar UV. Pengujian dengan sinar UV dilakukan untuk mengetahui pigmen fluorescent yang dimiliki oleh sampel bakteri. Koloni bakteri berpendar menunjukkan pigmen fluorescent yang dimiliki oleh bakteri dan dapat dinyatakan sebagai *P. fluorescens*. Sampel yang sesuai diremajakan pada media NA untuk dilakukan uji selanjutnya.

c.) Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Bakteri yang telah sesuai dengan label dilakukan pengamatan morfologi bentuk koloni yang telah diremajakan pada media NA. Pengamatan dilakukan dengan melihat bentuk, tepian, elevasi dan warna koloni bakteri yang tumbuh. Pengamatan koloni dapat dilakukan dengan melihat secara langsung atau menggunakan mikroskop.

Sampel bakteri yang tidak memerlukan media selektif untuk tumbuh, dilakukan penanaman pada media NA dan dilakukan pengamatan morfologi. Uji kesesuaian produk dilakukan dengan tahap selanjutnya didasarkan pada pengujian oleh Schaad *et al.*, (2001):

Uji Gram

Uji KOH Isolat bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil sebanyak 1 ose atau secukupnya, kemudian bakteri diletakkan di atas *object glass*. Tambahkan KOH 3% sebanyak 2 tetes pada *object glass*. Suspensi bakteri kemudian diaduk menggunakan jarum ose, diangkat dengan cepat dan berkali-kali. Ketika ditarik menggunakan jarum ose suspensi terasa berlendir, lengket, hingga membentuk seperti benang, maka bakteri termasuk dalam gram negatif. Bakteri yang tidak menunjukkan lengket ketika ditarik, maka bakteri termasuk dalam gram positif.

Pewarnaan Gram Isolat bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam dan muncul koloni tunggal, diambil sebanyak 1 ose atau secukupnya kemudian diletakkan pada *object glass*, ditambahkan akuades dan diratakan hingga homogen. Bakteri yang telah homogen difiksasi diatas Bunsen, selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan memberikan kristal violet (5%) sebanyak 2 tetes, dibiarkan selama 1 menit. *Object glass* yang telah kering dibilas dengan air mengalir dan difiksasi diatas Bunsen. Suspensi bakteri diberikan iodine sebanyak 2 tetes dan dibiarkan selama 1 menit.

Object glass dibilas kembali menggunakan air mengalir, dikeringkan di atas Bunsen, dan disemprot alkohol 70%. *Object glass* dibilas lagi dengan air yang mengalir, dikeringkan di atas Bunsen dan diberi safranin sebanyak 1 tetes, dibiarkan selama 1 menit. *Object glass* dibilas dengan air yang mengalir kemudian dikeringkan di atas Bunsen, selanjutnya bakteri dapat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Jika bakteri yang diamati di bawah mikroskop berwarna merah, maka bakteri termasuk Gram negatif, sedangkan bakteri yang menunjukkan warna ungu, maka bakteri termasuk dalam bakteri Gram positif.

Pewarnaan Spora uji pewarnaan spora dilakukan pada bakteri yang terlihat memiliki spora saat diamati saat pewarnaan gram, isolat bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil sebanyak 1 ose atau secukupnya kemudian diletakkan di atas *object glass* dan ditambahkan akuades. Suspensi bakteri difiksasi di atas Bunsen, ditetesi *melachite green* sebanyak 2 tetes dan dibiarkan selama 15 menit. Setelah 15 menit, *object glass* dibilas menggunakan air mengalir dan difiksasi di atas Bunsen. *Object glass* diberi safranin sebanyak 2 tetes dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, *object glass* dibilas menggunakan air mengalir dan dikeringkan, setelah kering *object glass* diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Jika spora berwarna hijau ketika diamati di bawah mikroskop, maka bakteri tersebut mampu membentuk spora dan termasuk dalam golongan bakteri bergenus *Bacillus*.

B. Perhitungan Kerapatan Koloni Bakteri

Perhitungan kerapatan koloni bakteri dilakukan pada bakteri yang telah sesuai dengan label kemasan produk agens hayati. Perhitungan kerapatan dilakukan dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Berikut cara perhitungan bakteri:

a.) Pengenceran

Produk agens hayati diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan pengenceran bertingkat. Sampel bakteri yang telah diperoleh dihomogenkan dan diambil sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 9 ml akuades menggunakan pipet. Tabung pertama merupakan pengenceran 10^{-1} . Pada tabung pertama dilakukan pengambilan sampel 1 ml suspensi kemudian dimasukkan dalam 9 ml akuades di tabung ke- 2, sampel kedua merupakan pengenceran 10^{-2} dan seterusnya hingga mendapatkan pengenceran 10^{-7} (Sunardi, 2001).

b.) Teknik Inokulasi Bakteri Menggunakan Spread *Plate*.

Setelah diperoleh hasil pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-9} , dilakukan inokulasi pada pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} sebanyak 3 kali ulangan dengan metode sebar (*spread plate*). Inokulasi dilakukan pada setiap sampel pengenceran yang diambil sebanyak 100 μ l menggunakan mikropipet dan disebar pada permukaan media NA. Suspensi yang telah diinokulasikan disebar secara merata hingga kering menggunakan stik L. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam dan diamati koloni yang tumbuh (Kadri, 2015).

c.) Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri

Pada isolat bakteri yang telah diinkubasi, dipilih cawan yang menghasilkan 30 – 300 koloni pada pengenceran yang dilakukan. Hasil perhitungan koloni yang sesuai dengan kriteria direrata dan dimasukkan dalam rumus (Dwidjoseputro, 2005):

$$\text{Jumlah koloni (cfu/ml)} = \frac{\text{Jumlah Koloni} \times \text{Faktor pengenceran}}{\text{Volume Sampel}}$$

Perhitungan koloni bakteri disarankan tidak dihitung jika melebihi dari 300 koloni pada setiap cawan. Metode hitung cawan yang lebih dari 300 koloni sulit untuk dihitung dan menyebabkan kesalahan dalam perhitungan (Sukandar *et al.*, 2010).

3. Pengujian Kontaminasi Bakteri Patogen Manusia

Pengujian dilakukan untuk mengetahui keberadaan bakteri patogen manusia yang menjadi kontaminan pada produk agens hayati. Bakteri patogen manusia yang diuji adalah bakteri patogen *E. Coli* dan *Salmonella* sp. Pertama dilakukan adalah menumbuhkan semua produk agens hayati pada media selektif Mac Conkey's Agar yang merupakan media selektif dari bakteri *E. coli* dan *Salmonella* sp. Produk agens hayati diinokulasikan pada permukaan media menggunakan metode *spread plate*. Petri yang telah berisi produk agens hayati diinkubasi di oven pada suhu 35° - 37°C selama 24 jam dan diamati koloni yang tumbuh. Koloni dengan ukuran besar dan media yang menunjukkan warna merah merupakan ciri dari bakteri *E. coli*. Sedangkan koloni yang transparan dengan ukuran lebih kecil dan media berubah warna menjadi kekuningan merupakan ciri dari keberadaan bakteri *Salmonella* sp (Lubis, 2015).

3.6 Teknik Analisa Data

Analisis data penelitian kualitatif dilakukan secara deskriptif dari hasil yang telah diperoleh selama wawancara, observasi lapang dan data hasil laboratorium. Pemaparan data yang diperoleh dilakukan secara deskriptif berupa kata-kata, gambar dan bukan angka. Variabel satu dengan lainnya sangat mempengaruhi ketika analisis, cara penyusunan data dilakukan dalam bentuk yang mudah di baca (Rahmat, 2009). Data hasil wawancara dan observasi dari PPAH dilakukan penilaian terhadap kriteria yang telah ditentukan. Indikator penilaian PPAH di Madiun dilakukan pada kondisi ruangan dan alat laboratorium serta kegiatan produksi dan kontrol kualitas terhadap produk agens hayati (Lampiran 2 sampai 5). Hasil penilaian berdasarkan indikator yang telah ditentukan disajikan dalam bentuk kategori (Tabel 1).

Tabel 1. Kategori Penilaian Hasil Wawancara di PPAH Madiun

Nilai	Kategori
0-20	Tidak baik
21-40	Kurang baik
41-60	Cukup baik
61-80	Baik
100-81	Sangat baik

Kategori penilaian hasil wawancara dan observasi di PPAH Madiun memiliki ketentuan bahwa, nilai 100-81 termasuk dalam kategori Sangat Baik, nilai 61-80 tergolong kategori Baik, nilai 41-60 tergolong kategori Cukup Baik, nilai 21-40 tergolong dalam kategori Kurang Baik, dan nilai 0-20 termasuk dalam kategori Tidak Baik.