

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Metode deskriptif merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mendeskripsikan atau menggambarkan peristiwa yang sedang berlangsung sebagaimana mestinya pada saat penelitian berlangsung. Tujuan dari penelitian deskriptif ini adalah untuk membuat deskripsi, gambaran, atau lukisan secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 1988).

Penelitian ini diawali dengan studi kepustakaan. Studi kepustakaan bertujuan untuk menggali informasi yang mendalam mengenai variabel-variabel penelitian. Selanjutnya dilakukan pra-penelitian, penelitian sebenarnya dan analisis data.

3.2. Waktu Penelitian dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari sampai dengan bulan April 2019 di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Pengambilan sampel tanah yang tercemar oleh oli bekas kendaraan bermotor dilakukan di Tasikmalaya, Jawa Barat.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah seluruh fungi yang terdapat pada tanah tercemar oli bekas kendaraan bermotor. Sampel dalam penelitian ini adalah fungi yang berhasil terisolasi dari tanah tercemar oli bekas kendaraan bermotor yang terdapat di Tasikmalaya, Jawa Barat.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan yang terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia yang terdapat pada tabel 1.1 (Lampiran 1.).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Tahap Persiapan

Tahap ini meliputi persiapan alat dan bahan yang selanjutnya dilakukan proses sterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf sebelum digunakan dalam proses penelitian. Bahan yang perlu di sterilisasi dimasukkan ke wadah kaca yang bersih dan diberi sumbat serta dibungkus oleh plastik sebelum di sterilisasi. Alat yang akan digunakan juga dibungkus dengan plastik, namun sebelumnya dilapisi dulu dengan kertas hingga rapat untuk menjaga agar tetap kering, setelah itu dilakukan sterilisasi dengan cara dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit menggunakan autoklaf. Alat-alat yang dimaksud adalah cawan petri, tabung reaksi, pipet, gunting bedah, beaker glass, gelas ukur, batang pengaduk dan spatula untuk tahap isolasi dan subkultur kapang. Kegiatan ini bertujuan untuk menjaga agar kegiatan penelitian dilakukan secara aseptik dan mencegah terjadinya kontaminasi dari mikroorganisme lain. Pada tahap persiapan dilakukan beberapa pembuatan media yang akan di gunakan adalah sebagai berikut:

3.5.1.1. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Sebanyak 39 gram *Potato Dextrose Agar* (PDA) dilarutkan dalam 1000 mL akuades kemudian dididihkan selama 1 jam. Setelah itu medium diangkat dan dibiarkan agak dingin dan ditambahkan larutan khloramfenikol 100 mg/L. Kemudian suspensi tersebut dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi masing-masing 15 mL suspensi agar untuk agar diri 3-5 mL untuk agar miring. Setelah itu masing-masing tabung reaksi ditutup rapat dengan sumbat dan kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Kusnadi et al., 2005).

3.5.1.2. Pembuatan Media *Potato Dextrose Broth* (PDB)

Sebanyak 26.5 gram *Potato Dextrose Broth* dilarutkan ke dalam 1000 mL akuades. Setelah seluruh bahan larut, lalu disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm.

3.5.1.3. Pembuatan Media *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS)

Pembuatan media SMSS padat Ditimbang CaCO_3 sebanyak 1 gram, NH_4NO_3 0,5 gram, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gram, KH_2PO_4 0,1 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 gram, Agar 2%, oli bekas kendaraan bermotor 4 ml, kloramfenikol dan akuadest 200 ml. Dicampurkan semua bahan hingga homogen dengan memanaskannya di atas *hotplate*. Sedangkan untuk media SMSS cair bahan dan takaran yang digunakan sama, tetapi untuk media SMSS cair hanya tidak ditambahkan agar didalamnya. dan tanpa pemanasan. Kemudian media disterilkan dengan menggunakan autoklaf (Darwis & Sunarti.1992).

3.5.1.3. Pembuatan NaCl 0.85%

Sebanyak 8,5 gram NaCl dilarutkan dalam satu liter akuades. Setelah seluruh bahan larut, lalu disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm.

3.5.2. Tahap Penelitian

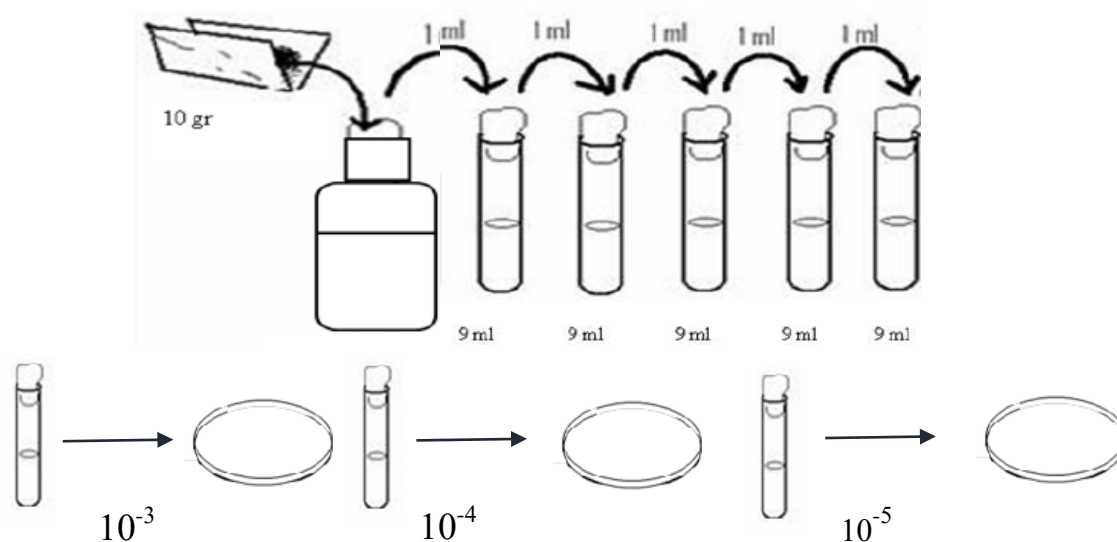
3.5.2.1. Pengambilan Sampel

Sampel tanah yang terkontaminasi oli bekas diperoleh dari tanah yang terkontaminasi oli bekas di Kawasan Singaparna, Tasikmalaya. Sampel tanah secara aseptik dikumpulkan menggunakan *soil sampler* sampai kedalaman 20 cm, dibungkus dengan aluminium foil dan dibawa ke laboratorium dalam waktu 48 jam, untuk kemudian dilakukan isolasi (Basuki, 2011). Sampel oli bekas yang digunakan sebagai sumber hidrokarbon adalah oli bekas dengan merk *Synthetic Top One Motor Oil SAE 20W-50*, API SL yang diperoleh dari bengkel motor di wilayah Singaparna, Tasikmalaya.

3.5.2.2 Isolasi Fungi

Isolasi fungi dilakukan dengan metode pengenceran berseri. Tanah ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 250 ml, 90 ml larutan garam fisiologis steril (0,85% NaCl) ditambahkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup. Suspensi tanah yang telah dikocok diambil 1 ml dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah mengandung 9 ml NaCl 0,85% steril, sehingga didapatkan suspensi dengan tingkat pengenceran 10^{-2} . Seterusnya dilakukan pengenceran dengan cara yang

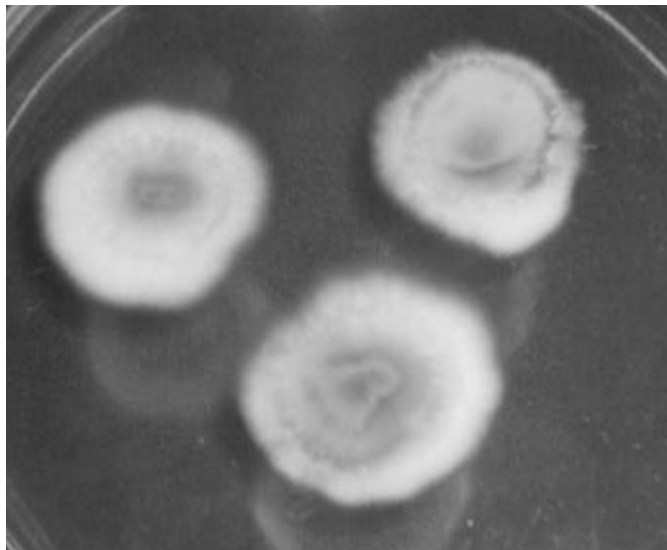
sama sehingga diperoleh suspensi 10^{-5} . Selanjutnya disebar dalam medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah dicampur dengan *Choramphenicol*. *Choramphenicol* merupakan salah satu zat anti bakteri yang mampu menekan bahkan mencegah perumbuhan bakteri. Pemberian anti bakteri pada media PDA bertujuan agar tidak ada bakteri yang hidup dan terisolasi pada media. Metode yang digunakan salam isolasi adalah metode cawan sebar. Biakan selanjutnya diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 25°C . Fungi yang telah tumbuh kemudian dipindahkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring untuk mendapatkan isolat fungi dan diinkubasi selama 3x24 jam dengan suhu 25°C (Strobel *et al.*, 1996).



Gambar 3.1. Isolasi Jamur

(Strobel *et al.*, 1996)

3.5.2.3. Skrining Fungi Pendegradasi Oli



Gambar 3.2. Koloni *Penicillium* sp. dalam medium PDA pada masa inkubasi 7 hari

Fungi terlebih dahulu ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk mendapatkan koloni terpisah dengan teknik cawan sebar. Koloni yang tumbuh terpisah untuk setiap strain fungi diinokulasikan di media *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) dengan menggunakan *kockborror* atau spatula. Diinkubasi selama 48 jam. Diamati apakah fungi tumbuh atau tidak dalam media SMSS. Skrining fungi pendegradasi oli ini dilakukan untuk melihat pertumbuhan isolat fungi di dalam medium *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS). Masing-masing isolat diinokulasi ke dalam medium padat dalam satu cawan Petri sebanyak 1 ose diatas medium *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) yang telah ditambahkan 1% oli pada titik yang berdeda. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan diameter masing-masing isolat yang diperoleh dari tiap titik koloni yang tumbuh pada cawan petri (Febrianto, 2017).

3.5.2.4. Identifikasi Isolat Fungi

Identifikasi isolat fungi dilakukan dengan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Untuk pengamatan secara makroskopis yaitu pengamatan terhadap bentuk dan koloni fungi. Sedangkan untuk pengamatan secara mikroskopis meliputi pengamatan terhadap bentuk hifa, spora aseksual, dan

sebagainya yang dilakukan dengan membuat *slide culture* (Balai Karantina Ikan, 2011). Ciri-ciri setiap isolat dibandingkan berdasarkan kunci determinasi pada *Introductory Mycology Fourth Edition* (Alexopoulos *et al.*, 1996), *Moulds Isolation, Cultivation, Identification* (Malloch, 1997), *Smith's Introduction to Industrial Mycology Seventh Edition* (Onions, *et al.*, 1981) (Lampiran 4).

3.5.2.5. Pembuatan *Slide Culture*

Slide culture dibuat dengan cara memasukkan penahan yang terbuat dari sumpit berbentuk segi tiga ke dalam cawan petri sebagai tempat untuk meletakkan objek gelas, kemudian disterilisasi. Sebanyak $\pm 1 \text{ cm}^2$ diletakkan di atas objek gelas kemudian diletakkan spora kapang di atas media. Selanjutnya diinkubasi selama 5 hari pada temperatur 25°C . Setelah hari ke-5 *Slide culture* diamati dengan menggunakan mikroskop (Balai Karantina Ikan, 2011). Hasil Identifikasi Kemudian dimasukkan ke dalam tabel dengan format yang telah disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2.

Format Identifikasi Fungi

| Kode isolat | Koloni | | Hifa | Spora seksual | Stuktur Konidia/Spora | Genus |
|-------------|--------|-------|------|---------------|-----------------------|-------|
| | Bentuk | Warna | | | | |
| | | | | | | |

3.5.2.6. Kurva Tumbuh Fungi

Kapang yang sudah diremajakan selama 7 hari pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) di cawan petri diambil menggunakan *cork borer* dengan diameter 6 mm sebanyak satu potong, selanjutnya bulatan agar yang mengandung isolat kapang diambil menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam 100 mL media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Kultur kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 hari. Pengukuran biomassa kapang dilakukan setiap 3 hari. Miselia kapang yang tumbuh di dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 60°C . Bobot kering miselia ditentukan dengan

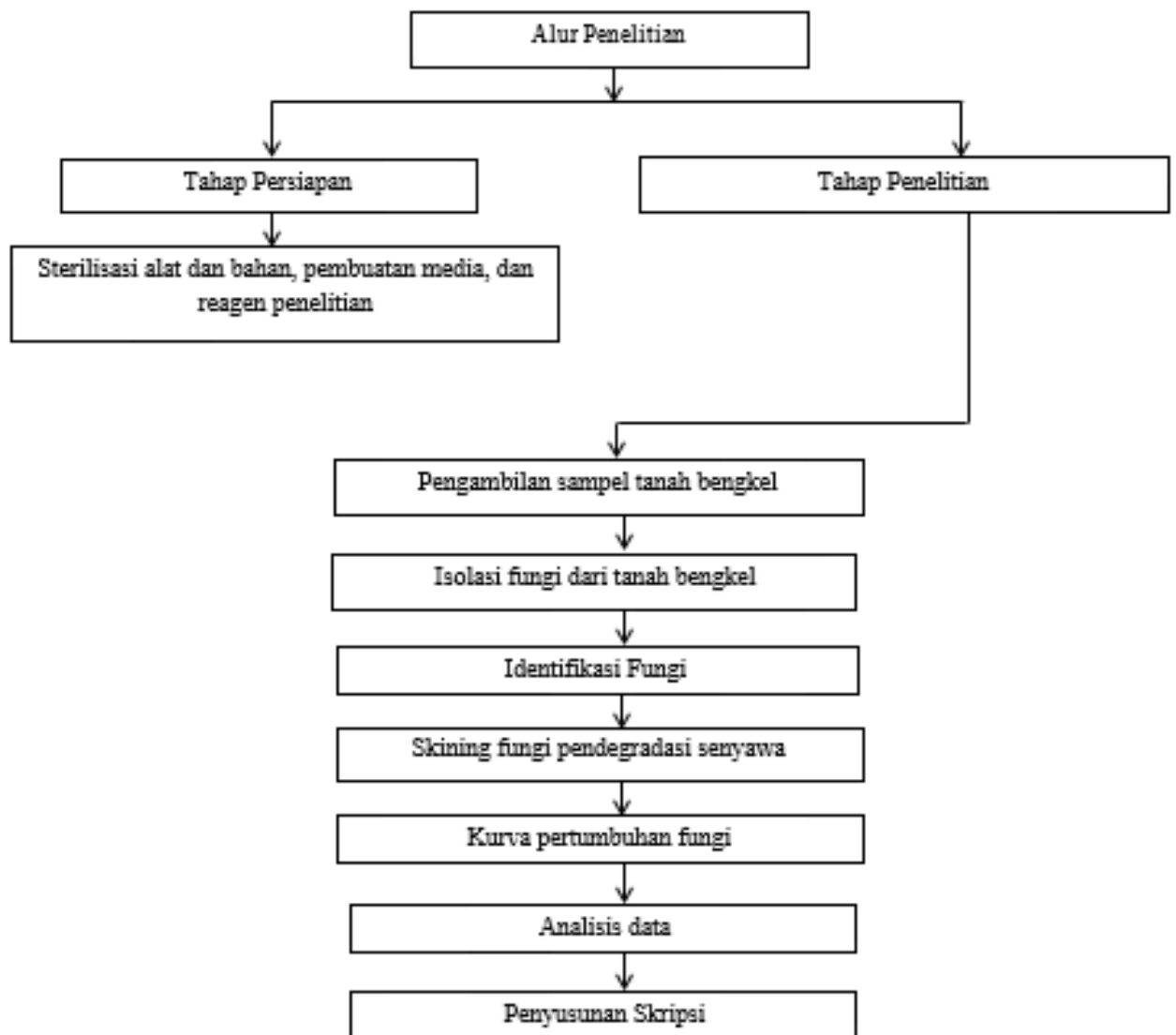
menghitung selisih bobot antara kertas saring kosong dengan kertas saring yang berisi miselia.

3.6. Analisis Data

Data hasil penelitian kemudian dideskripsikan hasil identifikasi berdasarkan kunci determinasi (Lampiran 4) dan dianalisis isolat fungi yang berpotensi sebagai remediator tanah yang tercemar oleh oli bekas kendaraan bermotor.

3.7. Alur Penelitian

Alur dari penelitian Isolasi dan Identifikasi Fungi yang Berpotensi sebagai Remediator Tanah Tercemar oleh Oli Bekas Kendaraan Bermotor dapat dilihat pada Bagan 1.



Gambar 3.1 Bagan alur penelitian