

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini mendeskripsikan peranan fungi yang berpotensi dalam pendegradasian limbah oli bekas kendaraan bermotor dengan analisis GC-MS, gravimetri dan perhitungan jumlah fungi.

3.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah isolat jamur yang berpotensi dalam proses pendegradasi limbah oli bekas kendaraan bermotor. Sampel dalam penelitian ini adalah isolat jamur *Penicillium*, *Aspergillus* dan *Trichoderma* yang teridentifikasi dari tanah yang tercemar limbah oli bekas kendaraan bermotor.

3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2020 selama ± 3 bulan. Pertumbuhan isolat jamur yang telah teridentifikasi dilakukan di Laboratorium Riset Lingkungan, Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Uji GCMS dilakukan di Laboratorium Instrumen Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan yang terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI dan Laboratorium Instrumen Kimia Universitas Pendidikan Indonesia (Lampiran I)

3.5. Prosedur Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dengan dua tahap, antara lain tahap pra-penelitian dan tahap penelitian.

3.5.1. Tahap Pra-Penelitian

3.5.1.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Tahap persiapan adalah persiapan alat dan bahan serta medium dan isolat jamur yang sudah teridentifikasi yang akan digunakan selama penelitian. Pada persiapan alat dan bahan dilakukan proses sterilisasi menggunakan autoklaf terlebih dahulu sebelum digunakan dalam penelitian. Untuk melakukan sterilisasi bahan, bahan yang digunakan harus dimasukkan ke dalam wadah kaca yang bersih dan diberi sumbat serta dibungkus oleh plastik anti panas. Untuk melakukan sterilisasi alat, alat yang digunakan harus dibungkus menggunakan kertas hingga tertutup rapat untuk menjaga alat tetap kering dan juga dibungkus menggunakan plastik anti panas. Kemudian alat dan bahan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

3.5.1.2. Peremajaan Jamur

Peremajaan jamur dilakukan dengan cara memindahkan atau memperbaharui biakan jamur dari biakan sebelumnya ke medium tumbuh yang baru secara berkala. Isolat jamur yang telah teridentifikasi sebelumnya dipindahkan dengan menggunakan *cork borer* ke dalam cawan petri yang berisi medium PDA. Hasil tersebut akan digunakan sebagai stok subkultur jamur.

3.5.1.3. Pembuatan Medium Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar (PDA) sebanyak 39 gram dilarutkan dalam 1000 mL akuades kemudian dipanaskan hingga homogen dan ditambahkan larutan kloramfenikol sebanyak 100 mg/L. Penambahan kloramfenikol dapat berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga bakteri tidak tumbuh pada media (Friambodo, 2017). Kemudian medium yang sudah dilarutkan dapat dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL suspensi untuk agar diri dan 3-5 mL suspensi untuk agar miring. Setelah seluruh bahan larut, kemudian medium disterilisasikan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Kusnadi, 2005).

3.5.1.4. Pembuatan Medium Stone Mineral Salt Solution (SMSS)

Medium *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) dibuat dengan komposisi 1 gram CaCO_3 ; 0,5 gram NH_4NO_3 ; 0,2 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 gram KH_2PO_4 ; 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Agar 2% dan kloramfenikol yang dilarutkan di dalam 200 mL akuades. Semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan dipanaskan di atas *hotplate*. Sedangkan untuk media SMSS cair komposisi dan bahan yang

digunakan sama, tetapi pada media SMSS cair tidak ditambahkan agar dan tidak dipanaskan. Kemudian media tersebut disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Darwis, 1992).

3.5.2. Tahap Penelitian

3.5.2.1. Uji Jamur Pendegradasi Oli

Isolat jamur terlebih dahulu ditumbuhkan pada medium PDA, kemudian setiap strain jamur diinokulasikan ke dalam medium *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) dengan menggunakan *cork borer* yang akan diinkubasi untuk mengamati pertumbuhan jamur di dalam medium SMSS dengan dua perlakuan yaitu kontrol dan perlakuan yang diberikan oli bekas.

Jamur diinokulasi sebanyak 1 *cork borer* yang dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer yang telah berisi medium SMSS cair steril sebanyak 100 mL dan ditambahkan oli bekas ke dalam erlenmeyer sebanyak 10 mL. Medium yang sudah ditambahkan dengan oli bekas dicampur menggunakan *shaker* selama 15 hari pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm (Febrianto, 2017). Kemudian setiap erlenmeyer diamati perhitungan jumlah jamur setiap tiga hari sekali yaitu pada hari ke-3, hari ke-6, dan seterusnya sampai hari ke-15 menggunakan metode Angka Kapang Khamir (AKK).

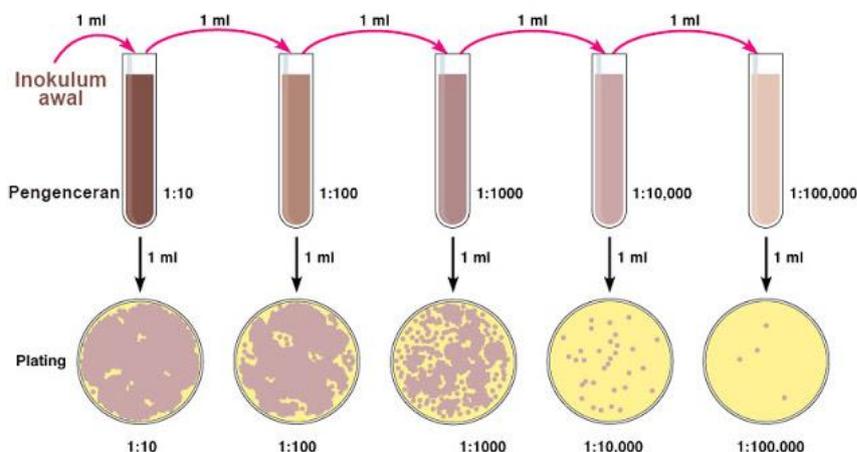
Uji jamur pendegradasi oli pada penelitian ini menggunakan kultur tunggal jamur yang terdiri dari *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp dan kultur konsorsium jamur yang terdiri dari: Konsorsium I : *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp.; Konsorsium II : *Aspergillus* sp. dan *Trichoderma* sp.; Konsorsium III : *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp.; dan Konsorsium IV : *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. Konsorsium ini dibentuk bertujuan untuk mengetahui perbedaan kemampuan dari isolat kultur konsorsium jamur dengan kultur tunggal dan jamur dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon yang terdapat pada limbah oli kendaraan bermotor.

3.5.2.2. Perhitungan Jumlah Jamur

Perhitungan jumlah jamur yang digunakan yaitu Angka Kapang Khamir (AKK) untuk jamur. Prinsip uji AKK yaitu pertumbuhan kapang dan khamir yang telah diisolasi dengan menggunakan metode *pour plate* pada medium yang sesuai dan diinkubasi pada suhu ruang. Jumlah koloni kapang dan khamir yang

ditumbuhkan dengan metode *pour plate* sebelumnya harus dilakukan metode pengenceran berseri (Utami, 2018).

Pengenceran dilakukan mulai dari pengenceran 10^{-1} sampai ke pengenceran 10^{-5} . Isolat jamur diambil sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah mengandung 9 mL aquades steril dan dihomogenkan menggunakan vortex sebagai pengenceran 10^{-1} , kemudian dilakukan pengenceran dengan cara yang sama sehingga diperoleh suspensi 10^{-5} (Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, 2013).



Gambar 3.1. Enumerasi total mikroba dengan metode pengenceran (Generasi Biologi, 2016)

Setiap pengenceran diambil sampel dan disebarkan pada medium *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) padat ke dalam cawan petri sebagai media tumbuh jamur dengan metode cawan sebar. Diinkubasi dalam inkubator jamur pada suhu 35°C selama 96 jam. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

Menurut Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan (2013), jika cawan petri terdapat jumlah koloni sebanyak 10-150 koloni, maka perhitungan yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$N = \frac{\Sigma C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Keterangan:

N = Jumlah koloni per mL (cfu/mL)

ΣC = Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung

n_1 = Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

n_2 = Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d = Pengenceran pertama yang dihitung

3.5.2.3. Analisis Minyak Terdegradasi secara Gravimetri

Kadar minyak oli pada hasil uji jamur pendegradasi oli dianalisis secara Gravimetri. Teknik gravimetri adalah teknik untuk mengurai kandungan polutan yang terkandung. Berdasarkan berat polutan yang didapatkan melalui proses ekstraksi yang dilarutkan dengan n-heksana. Proses ekstraksi dilakukan pada oli bekas dan sesudah diberi jamur pendegradasi oli. Tahapan pertama yang dilakukan adalah sampel oli diambil sebanyak 10 mL oli bekas yang dimasukkan kedalam labu erlenmeyer kemudian dilarutkan dengan 90 mL pelarut n-heksana sebagai zat pengekstrasi. Sampel kemudian diaduk hingga homogen, kemudian campuran oli dan n-heksana disaring dengan kertas saring. Oli dan n-heksana yang telah disaring dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL, kemudian diuapkan pada suhu 70°C sampai n-heksana habis. Lapisan oli yang tertinggal ditimbang beratnya (Sudrajat, 2015).

Pada sampel jamur pendegradasi oli dilakukan perlakuan yang sama dengan tahapan analisis gravimetri pada oli bekas. Total berat oli yang diekstraksi dapat diperoleh dengan menghitung selisih berat awal dan akhir sisa degradasi.

Data yang dianalisis adalah data awal oli bekas sebelum didegradasi oleh mikroba dan data akhir oli bekas setelah didegradasi oleh jamur, hasil degradasi dianalisis dengan cara menghitung berat minyak sisa degradasi (gravimetri). Rumus perhitungan persentase degradasi minyak bumi dapat dilihat, sebagai berikut:

$$\%TPH = \frac{(A - B)}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

%TPH = Persentase kadar minyak terdegradasi (%)

A = Kadar minyak awal (kontrol) (g)

B = Kadar minyak akhir (g)

3.5.2.4. Analisis Kandungan Senyawa Hidrokarbon

Analisis Kandungan Senyawa Hidrokarbon dilakukan dengan menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) untuk mengetahui perubahan senyawa hidrokarbon yang terdapat pada oli bekas dan oli bekas setelah didegradasi oleh jamur. Alat yang digunakan adalah GC-MS *Shimadzu* QP ultra 2010 dengan kolom RTX-5MS (panjang kolom 30 m dan

diameter 0,25 mm) dan gas pembawanya adalah helium, yang akan dilakukan di Laboratorium Instrumen Kimia FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia.

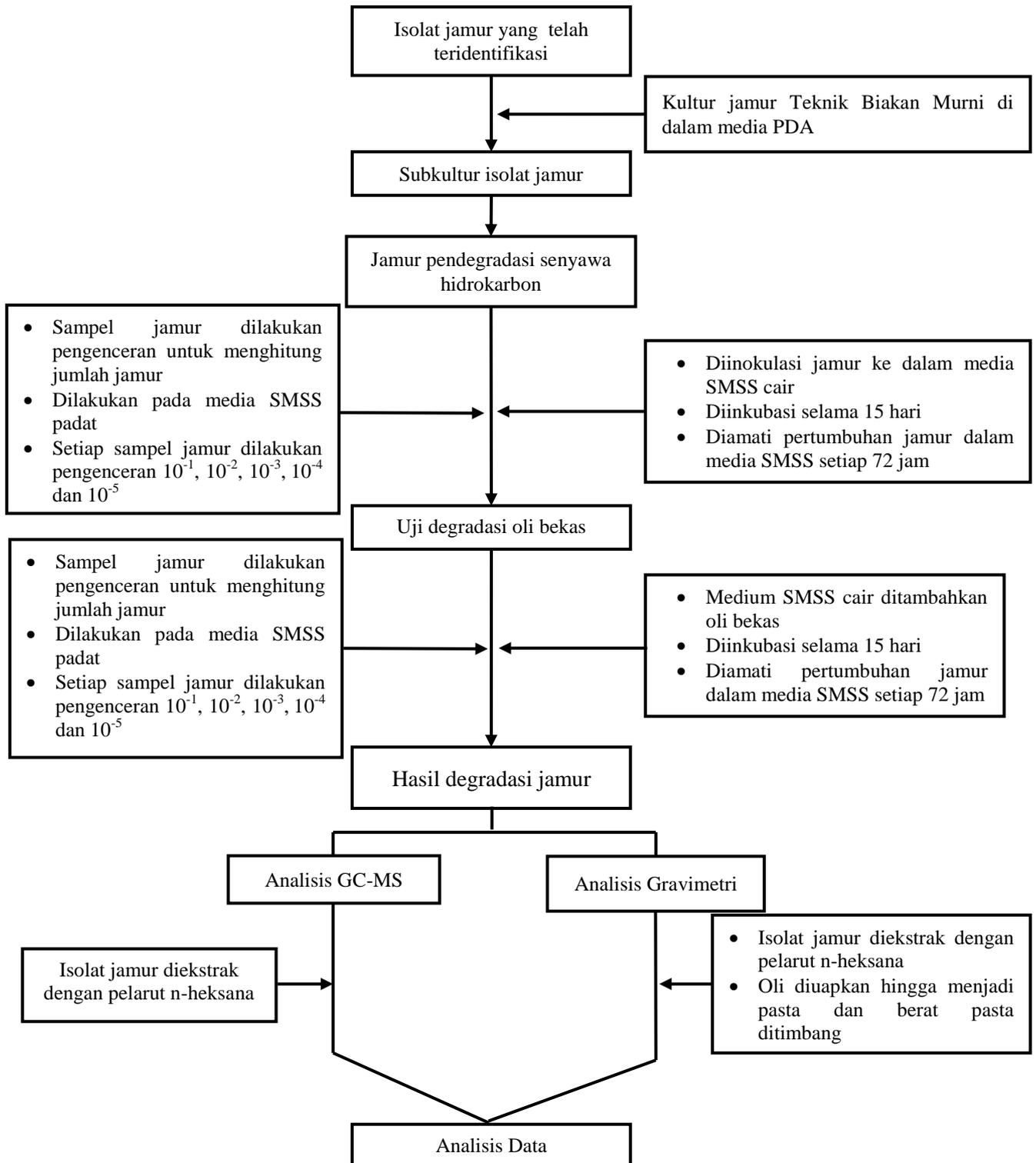
Sampel yang dianalisis adalah sampel oli bekas kendaraan bermotor dengan cara melarutkan 1 ml oli bekas dan hasil lapiran oli secara gravimetri kemudian dilarutkan ke dalam 4 ml n-heksana. Kemudian diambil 0,5 ml dimasukkan ke dalam tabung eppendorf lalu di sentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Kemudian terbentuk dua fase yaitu supernatant dan pellet. Selanjutnya supernatant dipindahkan ke dalam botol vial untuk dilakukan pengujian GCMS.

3.6. Analisis Data

Hasil data penelitian yang diperoleh adalah jumlah dari pertumbuhan jamur kemudian dianalisis data uji deskriptif melalui persentase kadar minyak hasil biodegradasi jamur dan perubahan komposisi senyawa hidrokarbon yang terdapat pada oli bekas kendaraan bermotor. Hasil data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif dan disajikan berupa tabel dan gambar.

3.7. Alur Penelitian

Pada penelitian Peranan Jamur Sebagai Remediator Dalam Proses Degradasi Limbah Oli Bekas Kendaraan Bermotor memiliki alur yang dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Bagan Alir Penelitian