

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Menurut Sugiyono (2013), penelitian eksperimen dapat diartikan sebagai metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendalikan. Penelitian ini meliputi sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media pertumbuhan bakteri, pengambilan sampel tanah, analisis kandungan logam pada tanah, isolasi bakteri, skrining bakteri yang resisten terhadap logam krom, pembuatan biakan murni, identifikasi bakteri yang resisten terhadap logam krom, pembuatan tumbuh isolat tunggal, penanaman konsorsium bakteri, uji kompatibilitas bakteri, pembuatan kurva laju pertumbuhan konsorsium bakteri, dan uji bioremoval logam kromium. Dalam penelitian ini, parameter yang diamati berupa kompatibilitas antar bakteri, pertumbuhan konsorsium bakteri, dan persentase bioremoval logam krom.

3.2 Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini menggunakan *Rancangan Acak Kelompok Tidak Lengkap (RAKTL)*. Rancangan Acak Kelompok adalah suatu rancangan acak yang dilakukan dengan mengelompokkan satuan percobaan ke dalam grup-grup yang homogen yang dinamakan kelompok dan kemudian menentukan perlakuan secara acak di dalam masing-masing kelompok (Christina *et al*, 2016). Menurut Montgomery (2009), jika tidak semua taraf perlakuan muncul pada setiap kelompok, maka dikatakan bahwa rancangan yang memuatnya adalah Rancangan Acak Kelompok Tidak Lengkap (RAKTL). Taraf perlakuan yang digunakan dalam percobaan ini berasal dari populasi yang terbatas dan pemilihan taraf perlakuannya ditentukan secara langsung oleh peneliti.

Dalam penelitian ini, terdapat dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok eksperimen. Kelompok eksperimen akan diberi perlakuan berupa variasi formula bakteri penyusun konsorsium pada media dengan penambahan krom, sedangkan kelompok kontrol tidak diberi perlakuan krom. Pada penelitian ini

menggunakan rumus Federer (1977) untuk menentukan banyaknya ulangan. Dengan rumus sebagai berikut.

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan.

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

Tabel 3.1 Rancangan Formula Konsorsium

Konsorsium	Kombinasi Bakteri				
Formula 1	A	B	C	D	
Formula 2	A	B	C		E
Formula 3	A	B		D	E
Formula 4	A		C	D	E
Formula 5		B	C	D	E
Formula 6	A	B	C	D	E

Formula konsorsium sebanyak 6 kombinasi (Tabel 3.1), berikut perhitungan banyaknya pengulangan dalam percobaan.

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas menggunakan rumus Federer, maka pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak empat kali. Menurut Hanafiah (2008), jumlah minimal pengulangan untuk penelitian eksperimental di laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan. Oleh karena itu, pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sudah memenuhi syarat.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Mei 2024 di Laboratorium Riset Prodi Biologi. Uji *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS) pada sampel tanah dilakukan di Laboratorium Pengujian Kualitas Lingkungan BINALAB.

Nur Aziema, 2024

UJI KEMAMPUAN FORMULA KONSORSIUM BAKTERI RHIZOSFER DALAM BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM SECARA IN VITRO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini berupa isolat bakteri dari rhizosfer tumbuhan di daerah tanah yang tercemar logam kromium pada industri penyamakan kulit. Sampel yang digunakan berupa konsorsium dari bakteri yang resisten terhadap logam kromium. Kombinasi untuk variasi formula konsorsium bakteri yang akan diuji ditentukan dengan metode *purposive*. Skema formula konsorsium bakteri yang digunakan berupa kombinasi dari seluruh jenis bakteri dan kombinasi dengan pengurangan satu bakteri di setiap formula. Adanya interaksi-interaksi positif dan negatif dalam setiap konsorsium menyebabkan perbedaan pada macam konsorsium unggul yang dihasilkan (Pikoli *et al*, 2018). Pengurangan satu bakteri dari setiap kombinasi untuk melihat seberapa besar kemampuan bakteri tersebut dalam mempengaruhi efisiensi bioremoval oleh konsorsium.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini sebagai berikut.

1. Variabel bebas, yaitu variasi formula konsorsium bakteri.
2. Variabel terikat, yaitu kompatibilitas antar bakteri, pertumbuhan konsorsium bakteri, dan persentase bioremoval logam kromium.
3. Variabel kontrol, yaitu media pertumbuhan bakteri, konsentrasi logam krom, dan waktu inkubasi.

3.6 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan yang terdapat di Laboratorium Riset Prodi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia (lampiran 1).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Tahap Persiapan

3.7.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Pada tahapan ini, seluruh alat dan bahan disiapkan lalu disterilisasi agar bebas dari segala bentuk kehidupan (steril) yang menjadi kunci dari keberhasilan dalam penelitian laboratorium (Cappucino & Sherman, 2013). Alat yang akan

disterilisasi dibungkus oleh kertas agar tetap kering kemudian dimasukkan kedalam plastik dan untuk bahan yang perlu disterilisasi dimasukkan ke wadah yang bersih berbahan kaca kemudian diberi sumbat, dibungkus kertas, dan bungkus plastik. Setelah dibungkus, alat dan bahan yang ingin disterilisasi dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi (Tille, 2017). Hal tersebut bertujuan untuk membunuh endospora mikroorganisme agar tidak terjadi kontaminasi (Alqum & Tarsono, 2019).

3.7.1.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Nutrient Agar (NA) HIMEDIA sebanyak 2,8% dari jumlah akuades dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu dilarutkan dalam akuades kemudian dipanaskan hingga homogen. Untuk pembuatan media Nutrien Broth (NB) sama seperti medium NA, NB Himedia sebanyak 1,3% dari jumlah akuades dilarutkan dalam akuades lalu dipanaskan hingga homogen. Setelah seluruh bahan larut, media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm. Setelah disterilkan, media dituangkan ke dalam tabung reaksi atau cawan petri sesuai kebutuhan.

3.7.2 Tahap Penelitian

3.7.2.1 Isolasi dan Karakterisasi Koloni Bakteri dari Sampel Tanah Rhizosfer

a. Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah berasal dari tanah tercemar logam krom yang berada di sekitar bak penampungan limbah krom dan terletak Jl. Jendral Sudirman, Kabupaten Garut. Pada Gambar 3.1 ditunjukkan titik pengambilan sampel ditentukan dengan menggunakan sistem plot yaitu ada 3 plot yang digunakan dengan kuadran minimum ukuran minimum ukuran 1x1 meter (Ellenberg & Dumbois, 2016).



Gambar 3.1 Titik Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil dari area rhizosfer tumbuhan dengan jenis tumbuhan yang mendominasi pada ketiga plot. Tanah diambil sebanyak 150 gram pada tanah dengan kedalaman ± 30 cm menggunakan *soil corer* dan pipa pvc yang telah dikustomisasi pada area rhizosfer tumbuhan yang tercemar logam krom. Faktor abiotik seperti pH dan suhu tanah diukur menggunakan *soil tester* pada setiap titik pengambilan sampel. Tanah dimasukkan kedalam plastik ziplock steril lalu diberi label dan dibawa ke Laboratorium Riset Lingkungan FPMIPA UPI.

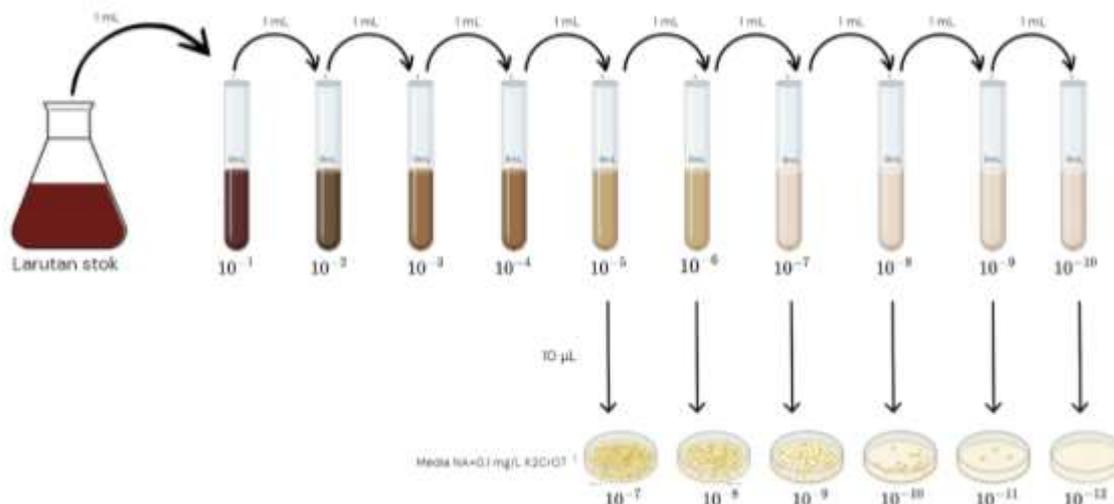
b. Isolasi Bakteri

Bakteri diisolasi dari sampel tanah rhizosfer yang tercemar logam krom. Sebelum dilakukan pengenceran, larutan stok tanah dibuat dengan cara menambahkan sampel tanah sebanyak 1 gr lalu dimasukkan ke erlenmeyer kemudian dilarutkan ke akuades hingga 10 mL. Lalu sampel tanah dilakukan dari pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-10} (Padma *et al*, 2023).

Sampel dari larutan stok diambil 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades yang telah disterilkan sebagai pengenceran 10^{-1} kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Setelah itu, pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL akuades steril untuk pengenceran 10^{-2} dan dihomogenkan menggunakan vortex. Perlakuan yang sama dilakukan hingga pengenceran 10^{-10} . Sampel untuk isolasi bakteri diambil pada pengenceran 10^{-5} hingga 10^{-10} (Gambar 3.2).

Pengenceran diambil sebanyak 10 μ L menggunakan mikropipet untuk dipindahkan pada media NA (Mian, 2021). Isolasi bakteri ini ditumbuhkan pada media NA dengan penambahan K_2CrO_7 sebanyak 0,1 mg/L kemudian diratakan menggunakan *spreader L* atau *glass rod spreader*. Setelah itu, media tersebut diinkubasi selama 18 jam pada suhu $37^\circ C$ (Baharuddin *et al*, 2020). Lalu media

diamati untuk melihat koloni yang berbeda lalu dipilih koloni dengan kepadatan populasi yang dominan dari setiap sampel tanah.



Gambar 3.2 Skema Pengenceran Sampel dan Isolasi Bakteri

c. Karakterisasi Koloni Bakteri

Setelah diinkubasi, dilakukan karakterisasi koloni bakteri dengan mengamati morfologi koloni secara makroskopis. Koloni dengan perbedaan morfologi dipilih berdasarkan bentuk koloni, warna koloni, tepian koloni, ukuran (diameter), dan kenaikan permukaan koloni (elevasi) (Cappucino & Sherman, 2013).

d. Pembuatan Biakan Murni

Biakan murni isolat bakteri di subkultur ke media agar miring steril dengan menginokulasikan 1 ose isolat ke dalam media agar miring. Kultur murni tersebut diinkubasi pada suhu 25°-37°C selama 24-48 jam (Ed-har *et al*, 2017).

3.7.2.2 Seleksi Bakteri Resisten Logam Krom

Isolat bakteri yang terpilih diinokulasikan dengan metode *streak continuous* dalam media NA selektif yang telah diberi K_2CrO_7 dengan variasi konsentrasi logam krom. *Range Finding Test* dilakukan untuk menentukan konsentrasi logam krom yang akan digunakan dalam penelitian (Trihadiningrum *et al*, 2014). Konsentrasi yang dipilih merupakan konsentrasi maksimum dimana pertumbuhan bakteri masih dapat diukur. Setelah bakteri dikultur pada media dengan konsentrasi krom yang akan digunakan, bakteri dipilih berdasarkan pertumbuhannya secara

Nur Aziema, 2024

UJI KEMAMPUAN FORMULA KONSORSIUM BAKTERI RHIZOSFER DALAM BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM SECARA IN VITRO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

kualitatif. Bakteri yang tidak tumbuh atau pertumbuhannya tipis menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak atau kurang resisten terhadap konsentrasi logam tersebut (Sari, 2022).

3.7.2.3 Identifikasi Bakteri Resisten Logam Krom

Isolat bakteri diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis, dan biokimia. Koloni dengan perbedaan morfologi dipilih berdasarkan bentuk koloni, warna koloni, tepian koloni, ukuran (diameter), dan kenaikan permukaan koloni (elevasi) (Cappucino & Sherman, 2013). Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan gram dan juga pengamatan bentuk sel (Kalsoom *et al.*, 2021). Identifikasi bakteri dilakukan dengan mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

Untuk pewarnaan gram, akuades diteteskan di kaca objek lalu isokulasikan 1 ose biakan bakteri dan difiksasi di atas api. Kristal violet diteteskan pada sediaan bakteri dan dibiarkan selama 60 detik lalu dicuci dengan akuade. Larutan lugol/iodin diteteskan dan dibiarkan selama 60 detik. Alkohol 96% diteteskan selama 30 detik kemudian 21 dicuci dengan air mengalir. Safranin diteteskan dan dibiarkan selama 60 detik lalu dicuci dengan akuades. Minyak imersi diteteskan pada preparat lalu diamati dengan mikroskop perbesaran 100x (Cappuccino & Welsh, 2020).

Untuk pewarnaan endospora, apusan bakteri dibuat lalu dilapisi kertas isap pada permukaan kaca objek. Pewarna *malachite green* diteteskan diatas kertas isap dan sediaan ditaruh diatas penangas air selama 5 menit. Selalu tetesi dengan pewarna, jangan sampai kering. Kelebihan warna pada kaca objek dibilas dengan air mengalir. Setelah itu, sediaan ditetesi dengan pewarna safranin dan dibiarkan selama 60 detik, dan dibilas dengan air mengalir. Minyak imersi diteteskan pada preparat lalu diamati dengan mikroskop perbesaran 100x. Endospora akan berwarna hijau sedangkan sel vegetatif berwarna merah. Amati juga letak endosporanya (Cappuccino & Welsh, 2020). Beberapa uji biokimia akan dilakukan sebagai berikut.

a. Uji Hidrolisis Pati

Isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan ke media pati agar secara zig-zag atau bentuk lain dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu

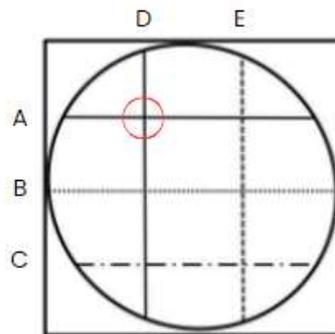
Nur Aziema, 2024

UJI KEMAMPUAN FORMULA KONSORSIUM BAKTERI RHIZOSFER DALAM BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM SECARA IN VITRO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.7.2.4 Uji Kompatibilitas Konsorsium

Bakteri penyusun konsorsium diuji kompatibilitasnya dengan metode *cross streak*. Isolat bakteri yang berbeda digoreskan secara vertikal dan horizontal pada media NA ke dalam petri dish (Hadi *et al*, 2021). Inkubasi dilakukan selama 24 jam dan diamati ada atau tidaknya lisis di titik pertemuan garis-garis tersebut (Gambar 3.3).



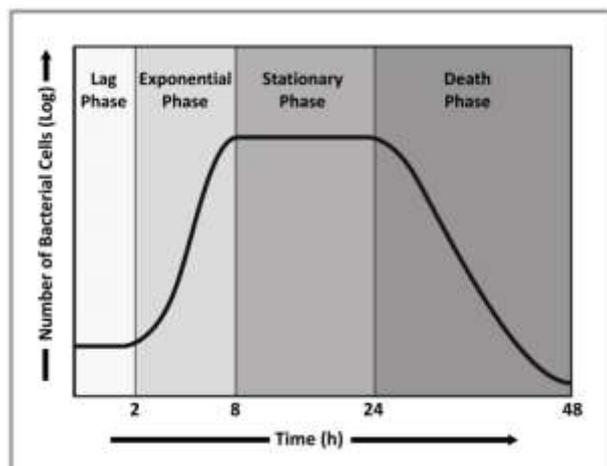
Gambar 3.3 Contoh Skema Garis Uji Kompatibilitas
(Keterangan. Titik perpotongan garis ditunjukkan oleh lingkaran merah)

Konsorsium bakteri akan kompatibel jika tidak ada zona penghambatan antar isolat bakteri (Sarkar & Chourasia, 2017). Interaksi ini dilihat dari keberadaan zona hambat dan ukurannya (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016). Zona hambat atau lysis diamati pada titik perpotongan antar garis (Al-Daghari *et al*, 2023). Adanya zona hambat atau lysis menunjukkan interaksi antagonisme antar bakteri sedangkan tidak adanya zona ini mengindikasikan sinergisme (Ethica *et al*, 2019).

3.7.2.5 Pembuatan Kurva Tumbuh Konsorsium Bakteri

a. Kurva tumbuh isolat tunggal bakteri

Isolat bakteri resisten logam krom yang terpilih ditumbuhkan pada media NB tanpa krom dan dengan penambahan krom untuk dibuat kurva pertumbuhannya. Satu ose isolat dari kultur diinokulasikan secara aseptis ke dalam 30 mL medium NB (Nutrient Broth) lalu diinkubasi selama 24 hingga 48 jam pada suhu 37°C dalam inkubator shaker dengan kecepatan 120 rpm. Nilai absorbansi nya diukur menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm setiap 2 jam.



Gambar 3.4 Grafik Representatif dari Kurva Tumbuh Bakteri

Pada Gambar 3.4 menunjukkan pertumbuhan dari bakteri yang memiliki beberapa fase. Dari kurva tumbuh bakteri pada media NB tanpa krom dapat diketahui umur perlakuan isolat untuk pembuatan konsorsium yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\mu = (a - b) / 2$$

Keterangan:

μ = umur kultur yang akan diberi perlakuan;

a = waktu fase log akhir;

b = waktu fase log awal

b. Pembuatan suspensi bakteri

Suspensi setiap bakteri digunakan untuk penanaman konsorsium bakteri. Metode ini diadaptasi dan dimodifikasi dari penelitian Zahroh (2018) sebagai berikut.

a. Botol kultur 100 ml disiapkan sebanyak jumlah bakteri penyusun bakteri yang telah diisi NB kemudian di sterilisasi dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

b. Bakteri diinokulasikan pada media NB lalu diinkubasi dalam inkubator shaker selama umur perlakuan yang telah didapat dari kurva tumbuh bakteri.

c. Pengukuran dan penetapan absorbansi pada OD = 0,2 dengan $\lambda = 600$ nm dengan cara dimasukkan suspensi bakteri dalam kuvet, kemudian diukur kekeruhannya menggunakan spektrofometer. Jika nilai OD yang terukur melebihi 0,2 maka

Nur Aziema, 2024

UJI KEMAMPUAN FORMULA KONSORSIUM BAKTERI RHIZOSFER DALAM BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM SECARA IN VITRO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dilakukan pengenceran dengan NB. Pengenceran suspensi untuk mendapatkan OD = 0,2 dengan $\lambda = 600$ nm dengan menggunakan rumus:

$$n1 \cdot V1 = n2 \cdot V2$$

Keterangan.

$n1$ = OD suspensi awal

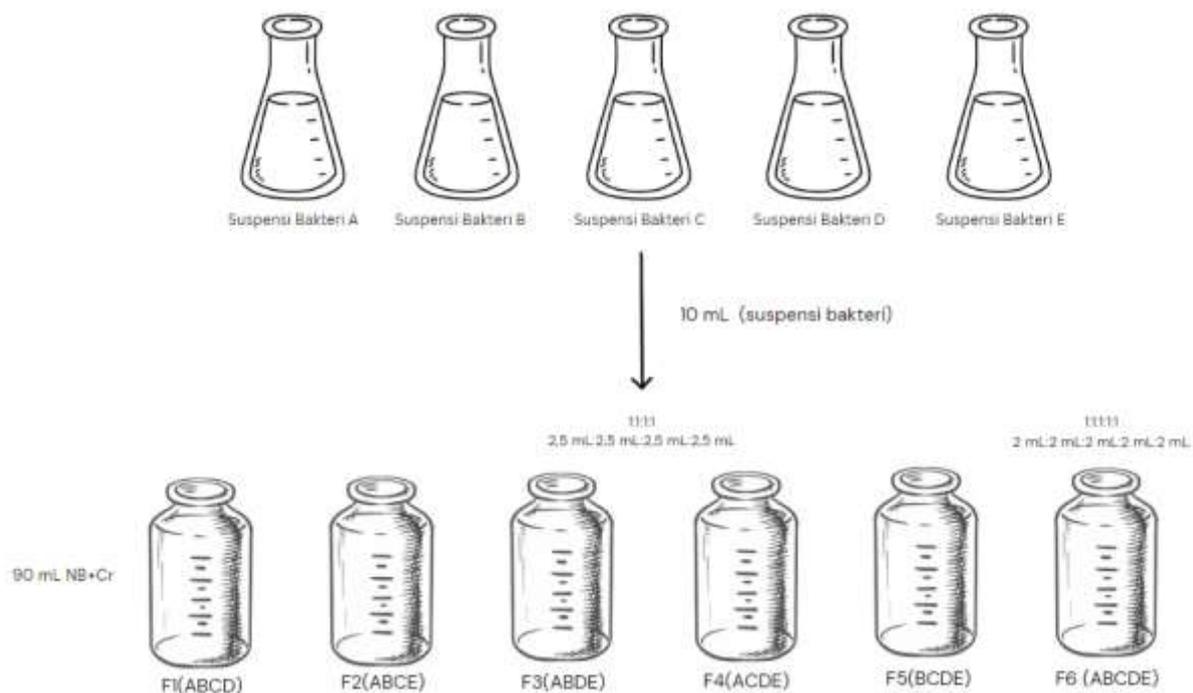
$n2$ = OD yang telah ditentukan

$V1$ = Volume suspensi awal yang ada

$V2$ = Volume total hasil pengenceran

c. Penanaman konsorsium

Setelah suspensi bakteri mencapai umur perlakuan (μ), suspensi tersebut diukur nilai OD dengan $\lambda = 600$ nm. Setiap bakteri pada formula konsorsium dengan OD = 0,2 diinokulasikan dalam botol kultur sebanyak 10 ml dengan perbandingan setiap bakteri 1:1 dalam media NB 90 mL yang mengandung 1000 ppm logam krom (Gambar 3.5). Konsorsium tersebut diinkubasi dalam inkubator shaker kecepatan 150 rpm dengan suhu 37°C selama 12 jam.



Gambar 3.5 Penanaman Konsorsium Bakteri

Nur Aziema, 2024

UJI KEMAMPUAN FORMULA KONSORSIUM BAKTERI RHIZOSFER DALAM BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM SECARA IN VITRO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

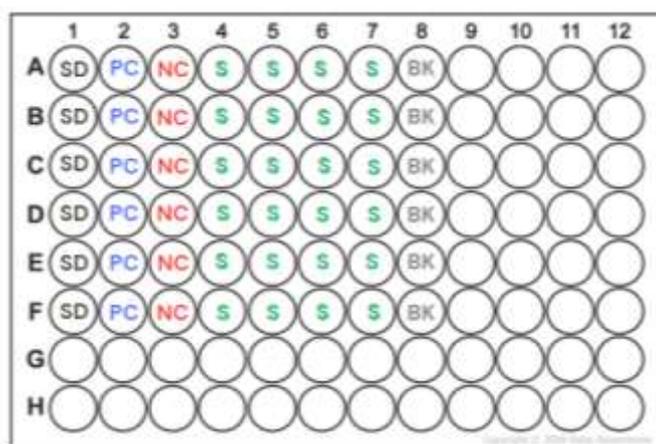
d. Perhitungan kurva tumbuh

Tiap kultur konsorsium diambil 1 ml lalu dimasukkan kedalam kuvet dan diukur nilai OD (*Optical Density*) dengan panjang gelombang 600 nm setiap 2 jam sekali selama 12 jam. Jumlah sel bakteri dihitung sampai menunjukkan jumlah yang menurun (Hardestyariki *et al*, 2020).

3.7.2.6 Pengukuran Bioremoval Logam Krom

Kultur konsorsium bakteri pada media NB-Cr diukur konsentrasi logam krom sebelum dan sesudah 12 jam menggunakan *microplate reader*. Analisa kolorimetri untuk krom dilakukan dalam *microtiter plate* menggunakan reagent DPC dengan mengukur absorbansi menggunakan *microplate reader*. Dalam microplate terdiri dari standar, blanko, kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan sampel (Gambar 3.5). Blanko dan standar menggunakan media NB. Kontrol positif berupa media dengan penambahan krom tanpa konsorsium bakteri dan kontrol negatif berupa media dengan konsorsium tanpa krom.

Dalam penelitian Hagiri *et al* (2024), disebutkan bahwa setiap sumur *microplate* terdiri dari 20 μL reagent 1,5-*diphenylcarbazide* (DPC), 20 μL 1.5 mol/L *sulfuric acid* (H_2SO_4), dan 300 μL sampel yang akan diuji. Larutan DPC dibuat dengan melarutkan 8 gr DPC dalam 1 L ethanol. Pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm dilakukan setelah 5-30 menit pencampuran larutan.



Gambar 3.6 Skema Layout Microplate

(Keterangan. SD: Standar; PC: Kontrol positif; NC: Kontrol negatif; S: Sampel; BK: Blanko)

Efisiensi removal yang dilakukan oleh konsorsium diukur dengan rumus sebagai berikut

$$\text{Efisiensi Bioremoval} = \frac{(H_0 - H_s)}{H_0} \times 100\%$$

Keterangan.

H_0 = konsentrasi logam krom awal

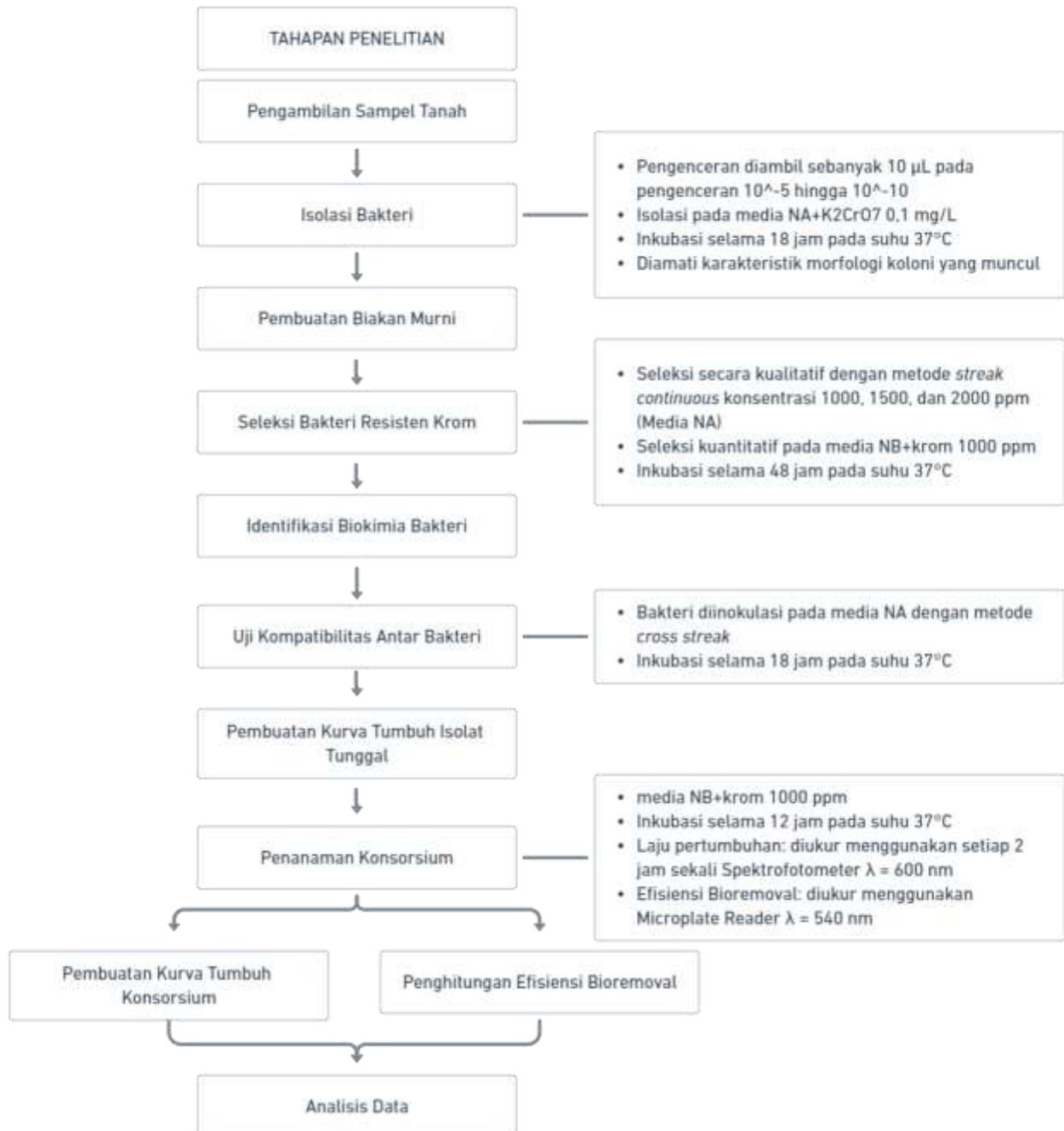
H_s = konsentrasi logam krom akhir

3.7.3 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa laju pertumbuhan konsorsium bakteri dan efisiensi bioremoval pada media konsorsium. Analisis data secara kuantitatif menggunakan software SPSS versi 25.0 yang diawali dengan tes normalitas lalu homogenitas. Data yang terdistribusi normal dianalisis secara statistik menggunakan *One-Way Analysis of Varians* (ANOVA) dengan $P < 0.05$. Data yang berdistribusi tidak normal dianalisis menggunakan *Mann-Whitney*. Tukey's (*post-hoc*) ($p < 0,05$) dilakukan setelah ANOVA untuk membandingkan nilai rata-rata diantara kelompok-kelompok yang dibandingkan (Hossan *et al*, 2020). Data dinyatakan sebagai rata-rata \pm standar deviasi (SD).

3.8 Alur Penelitian

Pada Gambar 3.7 menunjukkan alur penelitian "Uji Kemampuan Formula Konsorsium Bakteri Rhizosfer Dalam Bioremediasi Logam Kromium Secara In Vitro" sebagai berikut.



Gambar 3.7 Alur Penelitian