

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini berupa metode eksperimental dan deskriptif. Analisis kemampuan formula konsorsium bakteri dalam bioremediasi logam kromium menggunakan metode eksperimental. Penelitian eksperimental adalah metode penelitian yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh suatu perlakuan pada kondisi yang dikendalikan, penelitian eksperimental pun merupakan metode penelitian yang mampu menguji hipotesis mengenai hubungan kausal atau sebab-akibat (Sugiyono, 2013). Selain itu untuk mengidentifikasi bakteri digunakan menggunakan metode deskriptif. Penelitian deskriptif merupakan penelitian yang menggunakan variabel tunggal tanpa dihubungkan dan dibandingkan dengan variabel lainnya (Abdullah, 2018). Penelitian ini meliputi sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media pertumbuhan bakteri, pengambilan sampel tanah, pengujian kandungan kromium pada tanah, isolasi bakteri dari tanah, identifikasi bakteri, pembuatan kurva pertumbuhan bakteri tunggal, pembuatan konsorsium bakteri, uji interaksi antar bakteri, pembuatan kurva pertumbuhan konsorsium bakteri, dan uji pengurangan Cr(VI) menggunakan konsorsium bakteri. Parameter yang diamati pada penelitian ini, yaitu interaksi antar bakteri dan persentase pengurangan Cr(VI).

3.2 Desain Penelitian

Desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan dalam penelitian bioremediasi logam kromium ini karena bahan dan kondisi lingkungan yang digunakan homogen. Menurut Sunandi dkk. (2009), Rancangan Acak Lengkap (RAL) disebut acak karena masing-masing satuan percobaan memiliki peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan, kemudian disebut lengkap karena seluruh perlakuan yang dirancang dalam percobaan tersebut digunakan. Selain itu, menurut Akib (2014), RAL digunakan untuk membandingkan perlakuan yang ditempatkan secara acak pada satuan percobaan yang homogen. Variabel-variabel yang diamati dalam penelitian ini mencakup sebagai berikut.

1. Variabel kontrol: media pertumbuhan bakteri dan konsentrasi logam kromium pada media.

2. Variabel bebas: formula konsorsium bakteri.
3. Variabel terikat: persentase pengurangan Cr(VI) dan interaksi antar bakteri dalam konsorsium.

Hasil persentase pengurangan Cr(VI) menggunakan formula konsorsium bakteri akan dianalisis menggunakan uji statistik untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan (Sugiyono, 2013). Jumlah bakteri dan kombinasi konsorsium yang digunakan dalam penelitian ditentukan secara *purposive* berdasarkan uji resistensi bakteri. Pada Tabel 3.1 konsorsium yang digunakan yaitu sebanyak empat formula.

Tabel 3.1 Rancangan Formula Konsorsium

Konsorsium		Kombinasi Bakteri	
Formula 1	A	B	
Formula 2	A		C
Formula 3		B	C
Formula 4	A	B	C

Jumlah pengulangan dalam penelitian ditetapkan menggunakan rumus Federer (1955) dalam Hinkelmann (2015) sebagai berikut.

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

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

n = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini berupa biakan bakteri yang telah diisolasi dari tanah pada area *rhizosfer* tanaman yang tercemar limbah penyamakan kulit yang mengandung kromium di daerah Sukaregang, Kabupaten Garut. Sampel bakteri yang digunakan merupakan bakteri yang resisten terhadap konsentrasi logam kromium 500 ppm sehingga berpotensi untuk meremediasi logam kromium. Formula konsorsium bakteri yang akan digunakan, yaitu tiga jenis bakteri yang resisten terhadap logam kromium, serta pengurangan satu bakteri di setiap formula untuk melihat seberapa besar kemampuan bakteri tersebut dalam memengaruhi persentase pengurangan Cr(VI) oleh konsorsium.

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dikerjakan mulai dari bulan Desember 2024 hingga April 2025 di Laboratorium Riset Lingkungan, Program Studi Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA), Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).

3.5 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian bioremediasi kromium menggunakan konsorsium bakteri ini dicantumkan pada Lampiran 2. Alat dan bahan yang digunakan terdapat di Laboratorium Riset Program Studi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahap Persiapan

3.6.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan disterilkan dengan dibungkus kertas dan plastik tahan panas, lalu disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm (Cappuccino & Sherman, 2014).

3.6.1.2 Pembuatan Media

Pembuatan media dan reagen yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Lampiran 3.

3.6.2 Tahap Penelitian

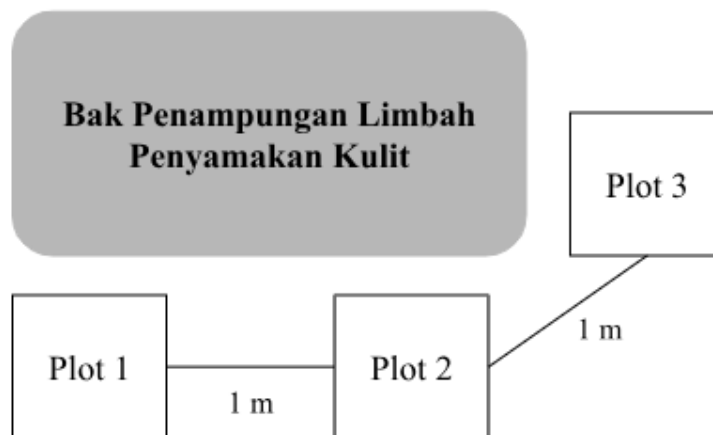
3.6.2.1 Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari lokasi sekitar bak penampungan limbah penyamakan kulit yang berada di Jalan Jendral Sudirman, Kabupaten Garut (Gambar 3.1). Penentuan lokasi plot pengambilan tanah dilakukan secara *purposive sampling*, yaitu berdasarkan keberadaan tumbuhan di sekitar bak penampungan limbah penyamakan kulit. Gambar 3.2 menunjukkan titik pengambilan sampel tanah pada tiga plot dengan ukuran kuadran 1x1 meter (Mueller-Dombois & Ellenberg, 1974). Tanah pada zona *rhizosfer* diambil hingga kedalaman 25-30 cm dari permukaan tanah (Barillot dkk., 2013; Processors & Growers Research Organisation, 2021). *Soil corer* dan pipa PVC digunakan untuk pengambilan

sampel tanah pada masing-masing plot, kemudian sampel tanah dimasukkan ke dalam *ziplock* steril.



Gambar 3.1 Area Bak Penampungan Limbah Penyamakan Kulit
(Dokumentasi pribadi, 2025)



Gambar 3.2 Titik Pengambilan Sampel Tanah
(Dokumentasi pribadi, 2025)

3.6.2.2 Uji Kandungan Kromium pada Tanah

Sampel tanah diuji kandungan kromium nya dengan menggunakan uji *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) di Laboratorium Binalab.

3.6.2.3 Isolasi Bakteri

Stok tanah dibuat agar tanah menjadi homogen terlebih dahulu sebelum dilakukan pengenceran bertingkat. Cara membuat stok tanah, yaitu dengan menyiapkan 10 mL aquades steril dalam erlenmeyer lalu sebanyak 1 gram sampel tanah dimasukan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan hingga homogen menggunakan *shaker*.

Salma Setia Nurhaliza, 2025

BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM MENGGUNAKAN KOMBINASI FORMULA DARI KONSORSIUM BAKTERI *Brevibacillus borstelensis*, *Bacillus licheniformis*, DAN *Bacillus* sp.

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

Pengenceran bertingkat dilakukan dengan membuat pengenceran 10^{-1} terlebih dahulu dengan cara mengambil 1 mL larutan stok tanah menggunakan mikropipet ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL aquades steril lalu dihomogenkan menggunakan *vortex*. Larutan 10^{-1} diambil sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi lainnya yang berisi 9 mL aquades steril untuk membuat pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilakukan hingga pengenceran 10^{-8} .

Larutan tanah pada tiga tingkat pengenceran terakhir yaitu 10^{-6} , 10^{-7} , dan 10^{-8} ditumbuhkan dalam media NA menggunakan metode *spread plate*, media yang digunakan telah ditambahkan $K_2Cr_2O_7$ dengan konsentrasi 100 ppm sebagai seleksi awal bakteri yang resisten terhadap kromium. Larutan sampel tanah pada pengenceran 10^{-6} diambil sebanyak 0,1 mL menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media NA, sehingga hasil pengenceran pada media NA tersebut menjadi 10^{-7} . Untuk membuat hasil pengenceran 10^{-8} dan 10^{-9} pada media NA dilakukan dengan cara yang sama menggunakan larutan tanah 10^{-7} dan 10^{-8} .

3.6.2.4 Uji Resistensi Bakteri Terhadap Kromium

Uji resistensi bakteri terhadap logam kromium dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif untuk menganalisis pada konsentrasi berapa bakteri hasil isolasi mampu bertahan hidup serta jenis bakteri apa saja yang resisten di lingkungan yang tercemar kromium tersebut. Uji resistensi secara kualitatif yaitu dengan melakukan *streak plate* pada media NA yang mengandung $K_2Cr_2O_7$ dengan konsentrasi 1500 ppm, 1000 ppm dan 500 ppm. Biakan bakteri yang mampu tumbuh pada media NA menunjukkan bahwa bakteri resisten terhadap kandungan kromium pada konsentrasi tersebut. Setelah dilakukan uji resistensi bakteri secara kualitatif maka dilanjutkan dengan uji resistensi bakteri secara kuantitatif untuk mengetahui perkiraan jumlah bakteri yang mampu tumbuh pada cekaman kromium. Masing-masing isolat bakteri ditumbuhkan pada media NB yang telah ditambahkan $K_2Cr_2O_7$ dengan konsentrasi yang mampu ditoleransi oleh biakan bakteri sesuai dengan hasil uji resistensi secara kualitatif sebelumnya (Apriliani, 2024).

3.6.2.5 Identifikasi Bakteri Resisten Kromium

Identifikasi bakteri resisten kromium yang akan digunakan dalam penelitian ini dilakukan dengan pengamatan mikroskopis, aktivitas biokimia, dan gen 16S rRNA.

3.6.2.5.1 Identifikasi Bakteri Secara Mikroskopis

Identifikasi bakteri secara mikroskopis yaitu dengan melakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora, sel bakteri kemudian diamati menggunakan mikroskop.

a. Pewarnaan Gram

Apusan bakteri resisten kromium dibuat dengan cara akuades ditetaskan pada permukaan kaca objek kemudian biakan bakteri diinokulasikan pada permukaan kaca objek tersebut dan difikisasi di atas api. Apusan bakteri yang telah dibuat lalu ditetesi dengan pewarna kristal violet yang merupakan pewarna primer, apusan bakteri didiamkan selama 60 detik, setelah itu dicuci menggunakan akuades untuk menghilangkan warna yang berlebih. Larutan lugol ditetaskan pada sediaan bakteri selama 60 detik, lalu dibilas dengan akuades. Alkohol 96% ditetaskan pada sediaan bakteri selama 30 detik untuk dekolorisasi, kemudian dibilas kembali dengan akuades. Selanjutnya ditetaskan pewarna Safranin yang merupakan *counterstain*, safranin dibiarkan selama 60 detik setelah itu dibilas kembali dengan akuades. Preparat bakteri ditetesi minyak imersi terlebih dahulu sebelum diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x (Cappuccino & Sherman, 2014).

b. Pewarnaan Endospora

Untuk melakukan pewarnaan endospora, dibuat terlebih dahulu apusan bakteri kemudian apusan bakteri dilapisi dengan kertas isap pada bagian permukaan kaca objek. Apusan bakteri ditetesi oleh pewarna *malachite green* sembari dipanaskan di atas penangas air selama lima menit, setelah itu dibilas menggunakan akuades. Pemanasan dilakukan untuk membuat pewarna dapat terserap ke dalam dinding endospora. Pewarna safranin ditetaskan pada preparat dan dibiarkan hingga 60 detik kemudian dibilas menggunakan akuades. Pewarna safranin digunakan untuk mewarnai sel vegetatif bakteri. Sediaan bakteri ditetesi minyak imersi terlebih dahulu sebelum diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x.

Endospora pada bakteri tampak berwarna hijau, sedangkan sel vegetatif tampak berwarna merah (Cappuccino & Sherman, 2014).

3.6.2.5.2 Identifikasi Bakteri Berdasarkan Aktivitas Biokimia

Aktivitas biokimia yang diuji dalam identifikasi bakteri mencakup uji hidrolisis pati, hidrolisis lipid, hidrolisis kasein, hidrolisis gelatin, uji katalase, produksi H_2S , motilitas, fermentasi karbohidrat, uji susu litmus, dan uji IMVIC.

a. Uji Hidrolisis Pati

Kultur bakteri diinokulasikan pada media agar yang mengandung pati, setelah itu media diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Setelah 24 jam, lugol ditetaskan ke permukaan media yang berisi bakteri. Hasil positif ditunjukkan dengan zona bening yang berada di sekitar bakteri (Cappuccino & Sherman, 2014).

b. Uji Hidrolisis Lipid

Kultur bakteri diinokulasikan pada media agar yang mengandung lipid, kemudian media diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Media lipid agar yang berisi bakteri diamati, zona bening yang terdapat di sekitar koloni bakteri menunjukkan hasil positif (Cappuccino & Sherman, 2014).

c. Uji Hidrolisis Kasein

Kultur bakteri diinokulasikan pada media agar yang mengandung susu skim bubuk, kemudian media diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Hasil positif uji hidrolisis kasein ditandai dengan zona bening yang berada di sekitar koloni bakteri (Cappuccino & Sherman, 2014).

d. Uji Hidrolisis Gelatin

Kultur bakteri diinokulasikan pada media gelatin lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Media yang berisi bakteri disimpan di dalam kulkas suhu $4^\circ C$ selama 30 menit. Hasil positif uji hidrolisis gelatin yaitu media yang tetap cair dan tidak membeku (Cappuccino & Sherman, 2014).

e. Uji Katalase

Kultur bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam diinokulasikan ke permukaan kaca objek, kemudian hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% ditetaskan pada biakan bakteri tersebut. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya gelembung udara setelah ditetesi hidrogen peroksida (Cappuccino & Sherman, 2014).

f. Uji Produksi H₂S

Kultur bakteri diinokulasikan pada media SIM agar yang mengandung ferrous ammonium sulfate dan natrium tiosulfat dengan cara ditusuk, lalu media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif dapat diamati dengan perubahan warna media menjadi hitam di sekitar jalur inokulasi (Cappuccino & Sherman, 2014).

g. Uji Motilitas

Kultur bakteri diinokulasikan dengan cara ditusuk ke dalam media SIM agar yang mengandung ferrous ammonium sulfate dan natrium tiosulfat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang bersifat motil akan memiliki pertumbuhan yang menyebar pada bekas tusukan media (Cappuccino & Sherman, 2014).

h. Uji Fermentasi Karbohidrat

Kultur bakteri diinokulasikan pada media NB yang mengandung dekstrosa, laktosa, dan sukrosa, setelah itu media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media yang berubah warna dari ungu menjadi kuning menunjukkan hasil positif (Cappuccino & Sherman, 2014).

i. Uji Susu Litmus

Kultur bakteri diinokulasikan pada media yang mengandung susu litmus, kemudian media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Perubahan warna media dari ungu menjadi merah muda merupakan ciri dari hasil positif (Cappuccino & Sherman, 2014).

j. Uji IMViC

Uji IMViC terdiri dari uji indol, Methyl Red (MR), Voges-Proskauer (VP), dan sitrat. Beberapa uji tersebut digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dari anggota Enterobacteriaceae yang beberapa di antaranya termasuk bakteri patogen (Cappuccino & Sherman, 2014).

1. Uji Indol

Kultur bakteri diinokulasikan pada media SIM agar yang mengandung ferrous ammonium sulfate dan natrium tiosulfat dengan cara ditusuk, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah media diinkubasi, biakan bakteri

ditetesi dengan reagen Kovac's. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya cincin berwarna merah pada permukaan media (Cappuccino & Sherman, 2014).

2. Uji *Methyl Red* (MR)

Kultur bakteri diinokulasikan pada media yang mengandung glukosa, kemudian media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media yang telah diinkubasi selanjutnya ditetaskan reagen *methyl red* (MR). Perubahan warna media yang mulanya bening menjadi merah menunjukkan hasil positif (Cappuccino & Sherman, 2014).

3. Uji *Voges-Proskauer* (VP)

Kultur bakteri diinokulasikan pada media yang mengandung glukosa, kemudian media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media berisi bakteri ditetaskan reagen *Barritt's A* dan *Barritt's B*. Perubahan warna media yang mulanya bening menjadi merah menunjukkan hasil positif (Cappuccino & Sherman, 2014).

4. Uji Sitrat

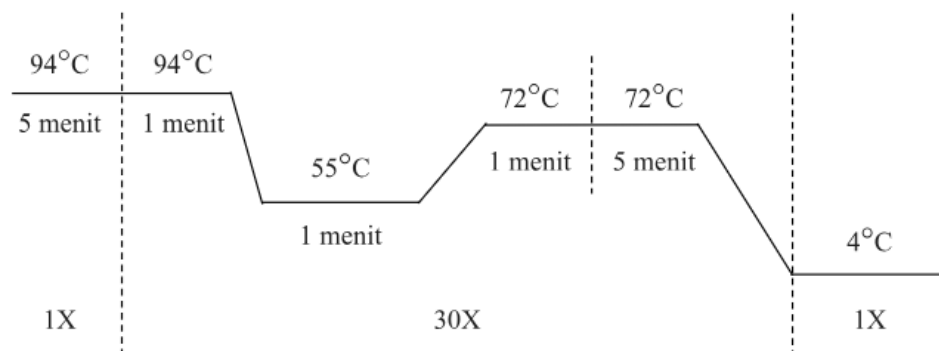
Kultur bakteri diinokulasikan pada media *Simmons sitrat* agar miring yang mengandung sodium sitrat, dikalium hidrogen fosfat, amonium dihidrogen fosfat, dan magnesium sulfat heptahidrat. Media *Simmons sitrat* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Perubahan warna media dari yang mulanya berwarna hijau menjadi biru merupakan ciri-ciri dari reaksi positif (Cappuccino & Sherman, 2014).

3.6.2.5.3 Identifikasi Bakteri Menggunakan Gen 16S rRNA

Identifikasi bakteri dapat dilakukan secara lebih akurat menggunakan metode molekuler yaitu menganalisis urutan DNA yang menyandi gen 16S rRNA (Fatwa dkk., 2021). Pada penelitian ini metode yang akan digunakan yaitu PCR koloni dari isolat bakteri. PCR koloni menggunakan sel utuh tanpa isolasi dan pemurnian DNA terlebih dahulu untuk mengamplifikasi DNA. Koloni bakteri yang telah ditumbuhkan pada media NA selama 24 jam diambil menggunakan tip pipet steril kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* berisi campuran reaksi untuk PCR yang terdiri dari 20 µL GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 µL primer *forward*, dan 1 µL primer *reverse*, 18 µL *Nuclease-free Water*. Primer yang digunakan adalah primer universal bakteri yaitu 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Jiang dkk., 2006; Vijayaraj dkk.,

2018; Sanjay dkk., 2020). Tahap amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus menggunakan Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler. Proses amplifikasi ditunjukkan pada Gambar 3.3 yang terdiri dari tahap predenaturasi yaitu dengan suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, elongasi awal pada suhu 72°C selama 1 menit, dan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil PCR disimpan pada suhu 4°C selama penyimpanan (Dinoto dkk., 2020).

Produk PCR divisualisasikan dengan proses elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dengan tegangan 100 volt. Tangki elektroforesis yang berisi larutan TAE 1X diisi dengan gel agarosa. Sampel hasil PCR ditambahkan *loading dye* SYBR Safe DNA Gel Stain dengan perbandingan 2:1, lalu dimasukkan ke dalam sumur gel. DNA ladder 1 Kb sebanyak 5µL yang telah ditambahkan loading dye 1µL dimasukkan ke dalam sumur gel untuk menentukan ukuran amplicon PCR dalam gel agarosa. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit. Gel yang telah dielektroforesis diambil dan ditempatkan ke dalam UV Transilluminator kemudian didokumentasikan (Nugraha, 2019).



Gambar 3.3 Kondisi PCR Gen 16S rRNA
(Dokumentasi pribadi, 2025)

Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan oleh 1st Base Laboratories menggunakan *Applied Biosystems Genetic Analyzer* dan *BigDye Terminator v3.1 sequencing kit*. Hasil sekuensing yang berupa urutan basa dari sekuen 27F dan 1492R dilakukan *trimming* untuk menghapus bagian sekuen yang tidak diinginkan, kemudian kedua sekuen tersebut dicontig untuk menggabungkan dua sekuen DNA menjadi satu kesatuan yang komplemen menggunakan *software* BioEdit. Sekuen DNA yang telah dicontig dibandingkan dengan data sekuen bakteri pada *gene bank* NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) menggunakan BLAST

(*Basic Local Alignment Search Tool*) pada laman <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Sekuen bakteri yang diidentifikasi dan sekuen bakteri dari *gene bank* dilakukan proses *alignment* untuk menyejajarkan beberapa sekuen yang didapatkan, kemudian dibuat pohon filogenetik menggunakan software MEGA-X (Iskandar dkk., 2021).

3.6.2.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Tunggal

Kurva pertumbuhan adalah kurva yang dapat menunjukkan fase pertumbuhan bakteri, pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dapat dibuat menggunakan metode turbidimetri dengan melihat nilai absorbansi dari alat spektrofotometer (Rosmania & Yanti, 2020). Masing-masing biakan bakteri diinokulasikan 1-2 ose pada 20 mL media NB tanpa penambahan kromium (kontrol) dan pada 20 mL media NB dengan penambahan $K_2Cr_2O_7$ 500 ppm. Kultur bakteri dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 10 menit lalu diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ hingga mencapai fase stasioner. Sebanyak 1 mL kultur bakteri dimasukkan ke dalam kuvet dan diamati pertumbuhannya berdasarkan nilai OD (*optical density*) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm, nilai OD dicatat setiap 2 jam sekali (Apriliani, 2024; Aziema, 2024).

Penentuan umur biakan bakteri yang akan digunakan dalam pembuatan konsorsium bakteri yaitu berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri tunggal pada media tanpa penambahan kromium. Sel bakteri dalam fase pertumbuhan eksponensial merupakan sel yang paling sehat dan paling seragam, sehingga sebagian besar percobaan menggunakan sel pada saat fase ini (Bruslind, 2019). Umur biakan bakteri yang akan diberi perlakuan dihitung melalui persamaan berikut (Sari, 2015).

$$n = (b - a) / 2$$

Keterangan:

n = umur bakteri tunggal yang akan diberi perlakuan

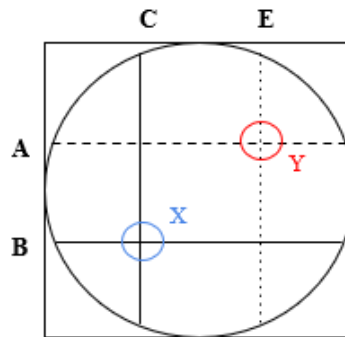
a = waktu fase log awal

b = waktu fase log akhir

3.6.2.7 Uji Interaksi Bakteri Penyusun Konsorsium

Biakan bakteri yang terseleksi dari hasil skrining diuji interaksinya dengan metode *cross streak* seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.4. Biakan bakteri yang berbeda digoreskan secara vertikal dan horizontal pada media NA dalam cawan petri lalu diinkubasi dengan durasi 48 jam dan diamati titik pertemuan garis-

garis koloni bakteri yang tumbuh (Hadi dkk., 2021). Interaksi bakteri yang menunjukkan sinergisme dapat dilihat dengan tidak terdapat lisis pada titik perpotongan garis, bakteri yang tumbuh letaknya sejajar, serta ukuran yang seragam pada masing-masing biakan bakteri. Sementara itu, bakteri yang tidak bersinergi dapat terlihat pada titik perpotongan garis dengan perbedaan ukuran, tumpang tindih antara isolat, dan munculnya isolat yang bersudut di perpotongan.



Gambar 3.4 Contoh Garis Uji Interaksi Bakteri
(X) Bersinergi, (Y) Tidak bersinergi
(Dokumentasi pribadi, 2025)

3.6.2.8 Pembuatan Konsorsium Bakteri

Langkah awal pembuatan konsorsium bakteri yaitu dengan mengukur nilai absorbansi kultur bakteri tunggal menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Supaya nilai OD dari setiap kultur bakteri tunggal memiliki nilai yang sama, ditetapkan nilai OD sebesar 0,2, sehingga apabila pada hasil spektrofotometer menunjukkan nilai OD lebih dari 0,2 maka kultur bakteri dilakukan pengenceran dengan menambahkan media NB hingga mendapatkan nilai OD 0,2. Pengenceran dapat menggunakan persamaan berikut.

$$n1.V1 = n2.V2$$

Keterangan:

$n1$ = OD suspensi awal

$n2$ = OD yang telah ditentukan

$V1$ = Volume suspensi awal

$V2$ = Volume total hasil pengenceran

Kultur bakteri dengan nilai OD 0,2 dan telah mencapai umur perlakuan (n) akan ditambahkan pada suspensi konsorsium. Sebanyak 2 mL kultur bakteri ditambahkan dengan perbandingan 1:1 ke dalam media NB 18 mL yang mengandung $K_2Cr_2O_7$ 500 ppm. Konsorsium tersebut dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 10 menit, kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ hingga kurva pertumbuhan konsorsium mencapai fase stasioner (Sari, 2022).

Salma Setia Nurhaliza, 2025

BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM MENGGUNAKAN KOMBINASI FORMULA DARI KONSORSIUM BAKTERI *Brevibacillus borstelensis*, *Bacillus licheniformis*, DAN *Bacillus* sp.

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

3.6.2.9 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Konsorsium Bakteri

Pertumbuhan masing-masing formula konsorsium bakteri dilakukan melalui pengamatan nilai OD konsorsium bakteri menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm, nilai OD dicatat setiap 2 jam sekali (Apriliani, 2024; Aziema, 2024).

3.6.2.10 Uji Pengurangan Cr(VI) Menggunakan Konsorsium Bakteri

Kandungan Cr(VI) pada media konsorsium dapat dianalisis menggunakan *microplate reader Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) karena hanya memerlukan volume sampel yang sedikit, waktu pengerjaan lebih cepat, dan memiliki sensitivitas yang tinggi (Coreño-Alonso dkk., 2017). Sumur yang terdapat pada *96-well plate* diisi dengan larutan sampel, blanko, kontrol positif, dan kontrol negatif seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.5. Larutan sampel berupa media NB dengan penambahan 500 ppm kromium yang telah ditambahkan konsorsium bakteri, blanko merupakan media NB tanpa penambahan kromium dan konsorsium bakteri, kontrol positif adalah media NB dengan penambahan kromium tanpa konsorsium bakteri, dan kontrol negatif merupakan media NB dengan penambahan konsorsium bakteri tanpa kromium. Metode kolorimetri dengan menggunakan larutan 1,5-diphenylcarbazine (DPC) mampu menghitung kandungan Cr(VI) pada suatu larutan (Sanchez-Hachair & Hofmann, 2018). DPC dapat bereaksi spesifik dengan Cr(VI) yang ada pada larutan $K_2Cr_2O_7$ dengan membentuk warna merah-ungu, semakin pekat warna merah-ungu tersebut maka semakin banyak kandungan Cr(VI) dalam larutan tersebut, sehingga warna tersebut yang akan diukur absorbansi nya menggunakan *microplate reader* (Lewaru dkk., 2012).

Konsorsium bakteri ditambahkan pada media NB yang mengandung 500 ppm $K_2Cr_2O_7$ kemudian diinkubasi pada suhu 37°C hingga kurva pertumbuhan konsorsium bakteri telah mencapai fase stasioner. Larutan sampel yang telah diinkubasi lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan pelet yang berupa sel bakteri dan supernatan yaitu larutan yang mengandung Cr(VI), sentrifugasi dilakukan agar sel bakteri tidak membuat bias pada hasil pengukuran absorbansi (Khanam dkk., 2024). Larutan sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif dimasukkan ke dalam sumur *96-well plate* sebanyak 300 μ L, kemudian ditambahkan dengan 20 μ L 8 g/L larutan 1,5-diphenylcarbazine

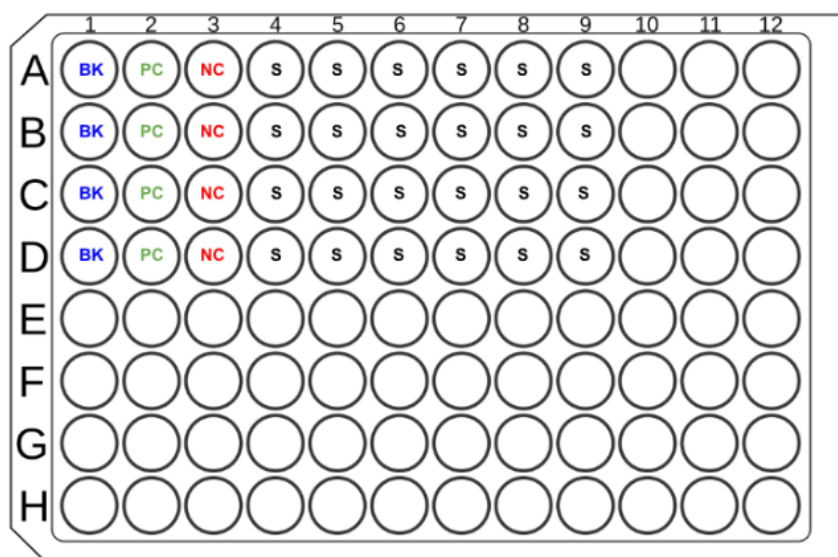
(DPC) dan 20 μL 1,5 mol/L H_2SO_4 (Aziema, 2024). Pengukuran absorbansi menggunakan *microplate reader* dilakukan pada panjang gelombang 540 nm untuk menganalisis kemampuan pengurangan Cr(VI) oleh masing-masing konsorsium bakteri. Persentase pengurangan Cr(VI) ditentukan dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Persentase Pengurangan Cr(VI)} = \frac{H_0 - H_n}{H_0} \times 100\%$$

Keterangan:

H_0 = Absorbansi sampel sebelum inkubasi

H_n = Absorbansi sampel setelah inkubasi



Gambar 3.5 Pengisian Sumur 96-well plate
(Dokumentasi pribadi, 2025)

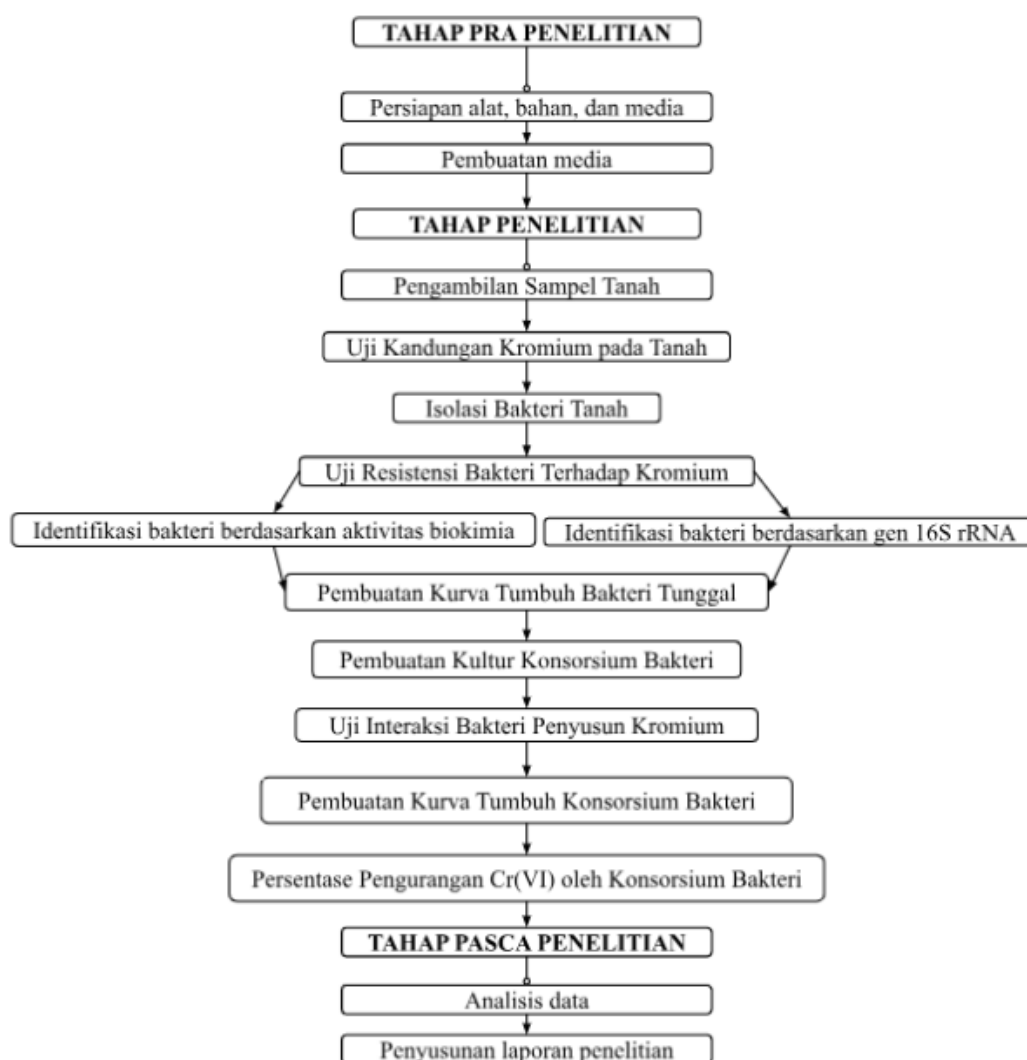
3.6.2.11 Analisis Data

Data pengurangan Cr(VI) oleh masing-masing formula konsorsium bakteri dianalisis secara statistik dengan menggunakan IBM SPSS Statistics 22. Data diuji menggunakan uji normalitas dan homogenitas. Uji homogenitas dilakukan untuk menganalisis varian data antar kelompok sama atau tidak, sedangkan uji normalitas untuk menganalisis apakah persebaran data berada di sekitar rata-rata atau tidak (Usmadi, 2020). Uji parametrik dilakukan jika data yang didapatkan berdistribusi normal serta homogen. Uji parametrik yang digunakan yaitu *One-way Analysis of Varians* (ANOVA). Uji *One-way* ANOVA digunakan untuk membandingkan rata-rata dari tiga kelompok independen atau lebih, kelompok independen merupakan kelompok yang tidak saling berhubungan (Arif dkk., 2023). Hasil yang menunjukkan adanya pengaruh dari perbedaan kelompok perlakuan terhadap parameter yang diukur perlu dilanjutkan dengan uji lanjutan yaitu menggunakan uji

Duncan. Uji *Duncan* merupakan uji untuk membandingkan nilai rata-rata dari setiap perlakuan, apakah terdapat perbedaan rata-rata kelompok perlakuan yang signifikan pada sampel penelitian (Munawwaroh dkk., 2023). Apabila data penelitian yang didapatkan tidak berdistribusi normal atau tidak homogen, maka uji yang digunakan yaitu uji non parametrik. Uji non parametrik yang digunakan yaitu uji *Friedman*, uji tersebut mampu menganalisis apakah terdapat perbedaan nilai dari setiap perlakuan (Basiludin & Kurniawan, 2023).

3.7 Alur Penelitian

Alur penelitian disusun dalam Gambar 3.6 berikut:



Gambar 3.6 Bagan Alur Penelitian
(Doumentasi pribadi, 2025)