

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental, dengan tujuan untuk mengukur efektivitas konsorsium bakteri yang diisolasi dan kemudian diidentifikasi menggunakan metode PCR dalam mengurangi kadar kandungan krom pada limbah dengan menghitung persentase kandungan krom yang berkurang setelah adanya perlakuan air limbah oleh pemberian konsorsium bakteri.

Penelitian dengan desain eksperimental bertujuan untuk menilai akurasi dari suatu teori dengan menggunakan serangkaian prosedur sistematis pada lingkungan penelitian yang terkendali dan objektif untuk mendapatkan hasil data yang lebih mendetail dan mendapatkan kesimpulan yang lebih detail dari teori yang digunakan (Webster & Sell, 2014).

Variabel yang diamati pada penelitian ini mencakup berbagai hal sebagai berikut:

1. Variabel Kontrol: media pertumbuhan bakteri, waktu inkubasi bakteri, konsentrasi cemaran logam kromium pada media
2. Variabel Bebas: kombinasi bakteri pada konsorsium
3. Variabel Terikat: persentase penghilangan krom oleh bakteri, kecocokan antar bakteri pada kombinasi konsorsium dan pertumbuhan bakteri pada konsorsium berdasarkan waktu inkubasi

Penelitian dirancang dengan menggunakan desain penelitian *posttest-only control group design*. dimana penelitian mengandalkan data yang didapatkan dari perbandingan antara hasil dari kelompok pasca uji penelitian pada sampel yang diberi perlakuan, dengan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan, perbandingan ini kemudian dianalisis menggunakan uji statistik untuk membandingkan dan melihat adanya perbedaan signifikan pada kelompok data yang diuji (Flannelly *et al.*, 2018). Kombinasi yang digunakan dalam konsorsium bakteri untuk penelitian ditentukan secara *random* dan isolat yang digunakan diambil dari hasil *screening* populasi bakteri terbanyak dan memiliki resistensi

terhadap kandungan kromium, dengan kombinasi bakteri ditunjukkan pada tabel (Tabel 3.1):

Tabel 3.1 Kombinasi Bakteri Pada Konsorsium

Konsorsium	Kombinasi Bakteri Konsorsium		
Kombinasi 1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
Kombinasi 2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus licheniformis</i>	
Kombinasi 3	<i>Bacillus</i> sp.		<i>Bacillus anthracis</i>
Kombinasi 4		<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>

Dari 3 bakteri berbeda didapatkan kombinasi bakteri untuk konsorsium sebanyak 4 kombinasi, kemudian akan dihitung untuk pengulangan yang akan dilakukan berdasarkan rumus Federer untuk menentukan banyak ulangan sebagai berikut.

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

Banyak pengulangan yang akan dilakukan dari sampel yang ada dihitung pada perhitungan berikut.

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

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

$$3(r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan penghitungan tersebut, pengulangan minimum pada penelitian ini adalah sebanyak 6 kali pengulangan.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri krom resisten yang akan diisolasi dari area *rhizosfer* tanah yang diambil di Sukaregang, Kabupaten Garut yang memiliki

Vinno Bayu Christofan, 2025

BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM MENGGUNAKAN KOMBINASI FORMULA KONSORSIUM BAKTERI *Bacillus* sp. , *Bacillus licheniformis* DAN *Bacillus anthracis* SECARA IN VITRO

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

potensi dalam bioremediasi limbah kromium. Pengambilan sampel yang diisolasi dan perancangan dari isolat setiap bakterinya dilakukan dengan *purposive sampling*. Sampel tanah yang digunakan dalam isolasi *rhizobakteri* diambil dari area rhizosfer tumbuhan yang tumbuh secara dominan pada lokasi tercemar krom yang menjadi lokasi sampling, sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsorsium dari rhizobakteri (kombinasi beberapa genus atau spesies bakteri) yang memiliki daya resistensi terhadap kandungan krom pada lingkungan hidupnya.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan dimulai dari bulan November 2024 hingga Maret 2025 di Laboratorium Riset Lingkungan Program Studi Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia. Untuk pelaksanaan sequencing dan analisis BLAST untuk identifikasi bakteri akan dilakukan oleh PT. Genetika Science Indonesia yang berlokasi di Tangerang

3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan ditampilkan dalam Lampiran (Lampiran 1)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian dilapisi dengan menggunakan kertas, lalu dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas, kemudian alat dan bahan disterilisasi menggunakan alat *autoclave* selama 30 menit pada suhu 121°C dalam tekanan 1 atm (Mustapha *et al.*, 2021).

3.5.1.2 Pembuatan Media

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah media nutrient agar dan nutrient broth, pada nutrient broth diberikan tambahan kandungan kromium dalam bentuk $K_2Cr_2O_7$ sebanyak 100 ppm untuk menjadikan media selektif bagi bakteri krom resisten. Kedua media dibuat dengan melarutkan serbuk bahan sebanyak 28 gram kedalam 1 liter aquades kemudian diaduk dan dipanaskan dengan menggunakan hot plate magnetic stirrer, pada media nutrient broth dilakukan hal yang sama dengan komposisi bahan pada nutrient broth tidak memiliki kandungan agar di dalamnya.

Vinno Bayu Christofan, 2025

BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM MENGGUNAKAN KOMBINASI FORMULA KONSORSIUM BAKTERI *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis* DAN *Bacillus anthracis* SECARA IN VITRO

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

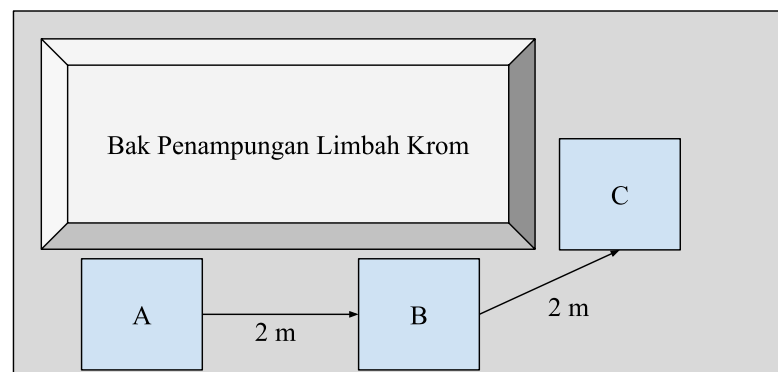
3.5.2 Tahap Penelitian

3.5.2.1 Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari kawasan pembuangan limbah pabrik penyamakan krom di kecamatan Sukaregang, kabupaten Garut (Gambar 3.1). Sampel tanah diambil dengan menggunakan plot pada kuadran 1x1 meter pada 3 plot. Plot yang digunakan ada tiga plot yang terletak di sisi bak penampung limbah ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.1 Area pengambilan sampel



Gambar 3.2 Plot Pengambilan sampel

Sampel diambil pada area yang ditumbuhi oleh tanaman, dengan tanah diambil pada bagian rhizosfer tanah dari tumbuhan dominan yang tumbuh pada area tersebut, tanah diambil pada kedalaman 30 cm sebanyak 150 gram, tanah

diambil dengan menggunakan *soil corer* dan pipa pvc termodifikasi. Faktor abiotik pada tanah di setiap plot juga diukur, yaitu dengan menggunakan *soil tester* untuk mengukur pH dan kelembaban serta termometer untuk mengukur suhu tanah, kemudian tanah dimasukan kedalam ziplock steril kemudian dibawa kembali ke laboratorium riset lingkungan FPMIPA UPI. Kandungan krom pada sampel tanah diuji dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS).

3.5.2.2 Isolasi Bakteri Tanah dan Seleksi Bakteri Resisten Krom

Sampel tanah rhizosfer yang sudah diperoleh kemudian dilakukan pengenceran, larutan stok tanah dibuat dengan melarutkan 1 gram tanah pada labu erlenmeyer dengan 10 mL aquades. Dari larutan stok dilakukan pengenceran dengan mengambil 1 mL dari larutan stok dan ditambahkan ke aquades 9 mL sehingga rasio air dengan larutan tanah sebanyak 1/10 mL Pengenceran dilakukan sebanyak 8 kali dari 10^{-1} sampai 10^{-8} .

Pada pengenceran 10^{-1} , diambil sebanyak 1 mL dari larutan stok lalu ditambahkan kedalam tabung reaksi berisi 9 mL aquades steril. Hasil pengenceran dihomogenkan dengan menggunakan vorteks dan diambil 1 mL setelah itu ditambahkan kedalam tabung reaksi berisi 9 mL aquades steril lalu dihomogenkan dengan menggunakan vorteks dan menjadi pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilakukan hingga mencapai pengenceran 10^{-8} . Sampel isolasi bakteri yang digunakan diambil dari hasil pengenceran 10^{-6} hingga 10^{-8} .

Isolasi diambil dari hasil pengenceran 10^{-6} hingga 10^{-8} sebanyak 10 μ L dengan menggunakan mikropipet ke media NA. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media NA dengan penambahan $K_2Cr_2O_7$ sebanyak 100 ppm, isolasi dilakukan dengan metode *spread plate* menggunakan *L glass rod spreader* lalu diinkubasi pada inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

Kultur yang sudah diinkubasi kemudian diamati dan dipilih koloni dengan kepadatan populasi paling dominan dari setiap sampel tanah. Koloni bakteri diamati secara morfologi melalui bentuk, warna dan elevasi dari setiap koloninya, lalu pada bakteri dengan media krom, diamati juga setiap koloninya dan dicocokkan dengan yang tumbuh pada media tanpa krom, kemudian bakteri dipindahkan ke kultur murni.

3.5.2.3 Pembuatan Kultur Bakteri Biakan Murni

Bakteri diambil dari hasil isolasi yang sudah dilakukan dari ekstraksi tanah di daerah pembuangan limbah kulit di Sukaregang, Garut. Isolat bakteri dipilih berdasarkan perbedaan karakteristik dan bentuk koloni, lalu dikultur dengan mengambil sebanyak satu ose dari cawan petri, kemudian dipindahkan ke media agar miring yang steril, kemudian diinkubasi menggunakan inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C.

3.5.2.4 Pewarnaan Bakteri

3.5.2.4.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan metode pewarnaan bakteri untuk mengidentifikasi apakah bakteri termasuk ke dalam Gram positif atau negatif, serta melihat karakteristik morfologinya, pewarnaan bakteri dilakukan dengan mengambil satu koloni dari kultur bakteri, kemudian diletakkan diatas kaca objek, lalu ditetaskan pewarna *crystal violet* lalu dibiarkan selama 1 menit, bilas dengan air lalu tetaskan larutan iodin kemudian dibiarkan selama 1 menit, lalu bilas dengan air, kemudian tetaskan alkohol 95% hingga kaca objek terlihat bersih kemudian di bilas dengan air mengalir, dan terakhir tetaskan safranin lalu biarkan selama 45 detik, bilas dengan air lalu keringkan dengan kertas tisu, kemudian diamati dibawah mikroskop. Bila bakteri berwarna ungu, menandakan bakteri adalah Gram positif, bila bakteri berwarna kemerahan, menandakan bakteri adalah Gram negatif (Sandle, 2015).

3.5.2.4.2 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora merupakan pewarnaan bakteri untuk melihat apakah bakteri memiliki kemampuan untuk memproduksi endospora, dimana endospora merupakan karakteristik krusial dalam survivabilitas bakteri dalam lingkungan yang tercekam, pewarnaan bakteri dilakukan dengan mengambil satu koloni dari kultur bakteri, kemudian diletakkan diatas kaca objek, lalu ditetaskan pewarna *malachite green*, setelah itu kaca objek diletakan di tempat dengan uap panas, kemudian tunggu hingga 5 menit lalu bilas dengan air, lalu tetaskan pewarna safranin dan dibiarkan selama 30 detik, selanjutnya dibilas dengan air lalu dikeringkan dengan kertas tisu, dan diamati dibawah mikroskop. Bila terdapat

objek berwarna hijau, menandakan bakteri mampu memproduksi endospora (Sandle, 2015).

3.5.2.5 Identifikasi Bakteri Resisten Krom

3.5.2.5.1 Identifikasi Bakteri Dengan Menggunakan Uji Biokimia

Bakteri yang telah didapat pada kultur murni kemudian diidentifikasi dengan menggunakan uji biokimia untuk mendapatkan dugaan genus dari bakteri yang sudah didapat, uji biokimia dilakukan sebagai metode identifikasi genus. Identifikasi bakteri dilakukan dengan menggunakan uji biokimia terlebih dahulu dikarenakan bakteri yang tidak memiliki karakteristik morfologi yang mencolok sebagai pembeda antar genus dan spesiesnya. Karena hal ini Rave *et al* (2019) mengemukakan bahwa uji biokimia dilakukan untuk melihat aktivitas metabolisme dan aktivitas enzimatis dari setiap bakteri sebagai ciri khas yang mengelompokkan setiap bakteri dalam suatu genus tersebut. Terdapat 13 uji aktivitas biokimia bakteri yang dilakukan, antara lain:

1. Uji Hidrolisis Pati

Hidrolisis pati merupakan uji untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam memecah karbohidrat polisakarida kompleks, melalui produksi enzim alfa amilase. Uji ini dilakukan dengan mengkultur bakteri pada media agar yang mengandung pati, lalu diinkubasi selama 24 jam, kemudian ditetaskan lugol lalu diamati keberadaan zona bening (Velmurugan *et al.*, 2021).

2. Uji Hidrolisis Lipid

Hidrolisis lipid merupakan uji untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam memecah lemak trigliserida melalui produksi enzim lipase kemudian diubah menjadi gliserol dan asam lemak. Uji dilakukan dengan menggunakan bakteri yang di *streak* ke media agar yang mengandung lemak trigliserida yang diberikan pewarna, lalu diinkubasi selama 24 jam kemudian diperhatikan penebalan warna merah pada media di sekitar zona *streak* (Madigan, 2012).

3. Uji Hidrolisis Kasein

Hidrolisis kasein merupakan uji untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam mendegradasi protein melalui produksi enzim ekstraseluler

proteinase. Uji dilakukan dengan menggunakan bakteri yang di *streak* ke media susu agar sebagai sumber kasein, lalu diinkubasi selama 24 jam kemudian diamati keberadaan zona bening (Brown *et al.*, 2015).

4. Uji Hidrolisis Gelatin

Hidrolisis gelatin merupakan uji untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri untuk memecah gelatin melalui memproduksi gelatinase. Uji dilakukan dengan menggunakan media mengandung gelatin, kemudian bakteri ditanam dengan menggunakan jarum ose untuk mengambil bakteri kemudian ditusuk ke media, lalu diinkubasi selama 24 jam kemudian ditaruh di kulkas selama 30 menit, jika medium cair, mengindikasikan bahwa bakteri memiliki kemampuan untuk menghidrolisis gelatin (Cruz & Torres, 2012).

5. Uji Katalase

Uji katalase digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang memiliki enzim katalase. Uji dilakukan dengan mengambil sebagian koloni bakteri, kemudian ditetaskan menggunakan H₂O₂ (hidrogen peroksida), jika ada gelembung menandakan bakteri memiliki enzim katalase (Das & Bhattacharyya, 2023).

6. Uji Produksi H₂S

Uji produksi H₂S digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan kemampuan untuk mereduksi senyawa sulfur menjadi H₂S. Uji dilakukan dengan menggunakan media yang mengandung Ferrous Ammonium Sulfat dan Natrium Tiosulfat, sebagai indikator H₂S, kultur ditanam dengan menggunakan jarum ose yang ditusuk ke media, lalu diinkubasi selama 24 jam, jika ada perubahan warna media menjadi gelap menandakan adanya produksi H₂S oleh bakteri (Thakur *et al.*, 2021).

7. Uji Indol

Uji indol digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim triptofan. Uji ini dilakukan dengan menggunakan medium yang mengandung tripton, lalu di kultur bakteri ke dalamnya dengan menggunakan jarum ose, kemudian

diinkubasi selama 24 jam, setelah itu ditetaskan reagen kovac, jika menghasilkan cincin berwarna kemerahan menandakan bakteri memiliki kemampuan untuk produksi enzim triptofan (Das & Bhattacharyya, 2023).

8. Uji Motilitas

Uji motilitas digunakan untuk mengetahui apakah bakteri memiliki sifat motilitas. Uji ini dilakukan dengan menanam bakteri menggunakan jarum ose ke media agar lalu diinkubasi selama 24 jam, jika bakteri semakin bertumbuh menuju arah bawah, menandakan bakteri memiliki motilitas. (Das & Bhattacharyya, 2023).

9. Uji *Methyl Red*

Uji methyl red digunakan untuk mengidentifikasi potensi bakteri tersebut dalam memproduksi asam dari glukosa. Uji ini dilakukan dengan menggunakan medium cair fosfat glukosa yang ditanam bakteri dengan menggunakan lub ose, kemudian diinkubasi selama 24 jam, setelah itu diberikan 3 tetes metil red sebagai indikator, indikator positif jika terjadi perubahan warna media menjadi warna merah setelah diberikan tetesan metil red (Das & Bhattacharyya, 2023).

10. Uji *Voges Proskauer*

Uji voges proskauer merupakan uji lanjutan dari uji methyl red, dimana uji ini mendeteksi kapasitas bakteri dalam melakukan metabolisme piruvat menjadi produk acetylmethylcarbinol atau acetoin, uji ini menggunakan media yang sama dengan uji methyl red, namun setelah diinkubasi selama 24 jam, media ditetaskan larutan barrit a (α -naphthol) dan barrit b (KOH), uji terindikasi positif jika setelah ditetaskan kedua larutan terjadi perubahan warna menjadi ungu kemerahan (Das & Bhattacharyya, 2023).

11. Uji Utilisasi Sitrat

Uji sitrat digunakan untuk identifikasi mikroorganisme yang memiliki kemampuan dalam menggunakan senyawa sitrat sebagai sumber karbon utama melalui produksi enzim sitrat permease. Uji dilakukan dengan menggunakan medium agar simmon sitrat yang mengandung kandungan amonia dan sitrat. media ditanami dengan dilakukan *streak* bakteri pada

agar simmon sitrat miring, kemudian diinkubasi selama 24 jam, jika terjadi perubahan warna medium menandakan bahwa bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utama (Das & Bhattacharyya, 2023).

12. Uji Susu Litmus

Uji susu litmus digunakan dalam identifikasi untuk menentukan kemampuan bakteri dalam melakukan metabolisme susu litmus melalui fermentasi laktosa, reduksi litmus, koagulasi kasein, proteolisis (pemecahan protein) dan hidrolisis kasein, uji ini dilakukan dengan menggunakan media susu skim yang diberi kandungan litmus, indikator positif dari uji ini untuk setiap kemampuan bakteri adalah perubahan warna media menjadi merah muda menandakan fermentasi laktosa, perubahan media menjadi putih pada bagian bawah menandakan reduksi litmus, pembentukan dadih menandakan koagulasi kasein, perubahan media menjadi berwarna kekuningan menandakan adanya reaksi proteolisis dan perubahan warna medium menjadi kebiruan pada hidrolisis kasein (Tille, 2017).

13. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat digunakan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam fermentasi karbohidrat, pada penelitian ini karbohidrat yang digunakan adalah laktosa, sukrosa dan dekstrosa, uji dilakukan dengan menggunakan media cair karbohidrat dan bromcresol purple sebagai indikator warna, dalam tabung berisi media juga dimasukkan tabung durham untuk melihat produksi gas, bakteri dikultur kemudian diinkubasi selama 24 jam, indikator positif adalah perubahan warna media menjadi warna kekuningan, jika tabung durham bergelembung, mengindikasikan adanya produksi gas (Reiner, 2012).

3.5.2.5.2 Identifikasi Bakteri Dengan Menggunakan Gen 16S rRNA

1. Amplifikasi Gen 16S rRNA Menggunakan PCR

DNA pada bakteri di amplifikasi dengan menggunakan *colony* PCR dari koloni yang tumbuh pada agar miring. Amplifikasi dengan metode *colony* PCR memungkinkan untuk amplifikasi DNA dilakukan secara langsung

dengan mengambil jaringan bakteri dari koloni bakteri pada media steril lalu dicampurkan dengan PCR master mix (Nouemssi et al., 2020). sejumlah kecil dari koloni bakteri dicampur dengan 20 µl GoTaq Green DNA Master Mix, 18 µl *Nuclease Free Water* (NFW), 1 µl primer 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1 µl primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). PCR dilakukan dengan berbagai kondisi, yaitu kondisi pra-denaturasi (94°C selama 5 menit), denaturasi (94°C selama 1 menit), penempelan primer pada rantai (*annealing*) (55°C selama 1 menit) *elongation* (72°C selama 1 menit) dan *post-extension* (72°C selama 5 menit). Proses dilakukan sebanyak 30 siklus dengan menggunakan mesin PCR Veriti 96 Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems), kemudian hasil PCR disimpan pada suhu 4°C. (Dinoto et al. 2020). Tahap ini dilakukan oleh Badan Riset dan Inovasi Nasional.

2. Visualisasi Gen Menggunakan Elektroforesis

Elektroforesis digunakan untuk memberikan visualisasi dari gen 16S rRNA yang telah di amplifikasi, gen ini nantinya akan diseparasi dengan elektroforesis gel, proses ini dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 1% dan marker 1 kb dan *loading dye* SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific), dengan perbandingan sampel DNA dan *marker* dengan *loading dye* adalah 2 : 1 (2 DNA dan *marker* serta 1 *loading dye*), kemudian dilakukan elektroforesis selama 30 menit, kemudian hasil visualisasi diwarnai, kemudian diamati lalu dideteksi dengan menggunakan sinar UV (Nugraha, 2019; Noer, 2021; Syah, 2022). Tahap ini dilakukan oleh Badan Riset dan Inovasi Nasional.

3. DNA Sequencing

Produk hasil PCR yang sudah diperoleh kemudian dikirimkan ke PT. Genetika Science Indonesia, Tangerang untuk dilakukan proses *sequencing* dengan 2 *reaction single pass sequencing*.

4. Identifikasi dengan menggunakan BLAST

Hasil dari *sequencing* gen 16S rRNA kemudian dianalisis menggunakan *software* MEGA 11 untuk membandingkan dan analisis jarak matriks antar genetik melalui perbandingan menggunakan database *GenBank*

dengan aplikasi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk nukleotida kemudian dilakukan konstruksi pohon filogenetik (Syah, 2022).

3.5.2.6 Pembuatan Kurva Tumbuh Isolat Bakteri Tunggal

Kurva tumbuh pada pertumbuhan bakteri dilakukan untuk menentukan pertumbuhan bakteri melalui penilaian pada kesamaan nilai *optical density*. Kurva dibuat dengan mencari nilai *optical density* bakteri dengan rentang 0.2 - 0.9, kemudian dimasukkan kedalam grafik yang akan membentuk data pertumbuhan.

Setiap isolat yang sudah dikultur kemudian akan dibuat kurva tumbuh untuk menentukan usia dari bakteri yang digunakan dalam perlakuan. Kurva akan dibuat berdasarkan perubahan populasi bakteri saat tumbuh pada media *nutrient broth* tanpa penambahan krom (media kontrol) dan saat media *nutrient broth* ditambahkan krom. Isolat kemudian diinokulasikan dari biakan murni kedalam 20 mL media *nutrient broth* untuk pengamatan kurva kontrol dan kedalam 20 mL media *nutrient broth* dengan penambahan $K_2Cr_2O_7$ 1000 ppm. Kultur dalam *nutrient broth* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *shaker* selama 10 menit, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Kurva tumbuh dibuat dengan mengamati perubahan pada *optical density* melalui alat spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sebagai representasi dari populasi bakteri. Pertumbuhan diamati selama 48 jam atau sampai pertumbuhan pada fase stasioner dengan interval yang dicatat pada pengamatan adalah setiap 2 jam

3.5.2.7 Penentuan Umur Uji Bakteri untuk Perlakuan

Umur dari isolat yang digunakan dalam pengujian reduksi krom dan kompatibilitas akan ditentukan berdasarkan kurva tumbuh bakteri pada media kontrol, kemudian dihitung menggunakan rumus berikut

$$\mu = \frac{a-b}{2}$$

μ = Umur Konsorsium

a = Waktu fase log akhir

b = Waktu fase log awal

3.5.2.8 Pembuatan Konsorsium

Isolat bakteri yang menjadi suspensi konsorsium kemudian dilakukan pengukuran dan penetapan nilai *optical density* menggunakan spektrofotometer pada nilai *optical density* 0.2 dengan panjang gelombang 600 nm. Jika nilai *optical density* yang terukur melebihi 0.2 kultur akan diencerkan dengan

menambahkan media *nutrient broth* sampai mendapat nilai *optical density* yang diharapkan. Persamaan yang digunakan untuk pengenceran adalah sebagai berikut.

$$n1.V1 = n2.V2$$

$n1$ = OD suspensi awal
 $V1$ = Volume suspensi awal
 $n2$ = OD suspensi ditentukan
 $V2$ = Volume total hasil pengenceran

Isolat yang sudah memiliki nilai *optical density* yang diharapkan kemudian ditambahkan pada suspensi konsorsium dengan rasio perbandingan 1:10 dengan menambahkan 1 ml masing masing isolat pada konsorsium 2 bakteri kedalam 18 ml media NB yang sudah dicampurkan kromium sebanyak 500 ppm dan 0.67 ml masing masing isolat pada konsorsium 3 bakteri kedalam 18 ml media NB yang sudah dicampurkan kromium sebanyak 500 ppm pada botol sampel 25 mL. Suspensi kemudian dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 10 menit, kemudian diinkubasi dengan durasi 12 jam pada suhu 37°C.

3.5.2.9 Uji Kompatibilitas Bakteri

Bakteri yang terpilih melalui *screening* resistensi krom kemudian diuji kompatibilitasnya untuk mendapatkan kombinasi konsorsium yang paling optimal, metode yang digunakan untuk uji kompatibilitas ini dengan menggunakan metode *cross streak*, dimana bakteri yang berbeda digores secara vertikal dan horizontal pada media *nutrient agar* pada cawan petri, kemudian diinkubasi pada inkubator pada suhu 37°C dengan durasi 48 jam. Setelah 48 jam, titik garis koloni bakteri yang tumbuh diamati. Isolat yang tidak menunjukkan adanya lisis antar kedua isolat bakteri ataupun zona hambat menandakan bahwa kedua isolat tersebut kompatibel dan cocok untuk dibiakkan bersama (Denaya *et al.*, 2021).

3.5.2.10 Uji Reduksi Krom

3.5.2.10.1 Kuantitas Pertumbuhan Konsorsium

Pertumbuhan dari konsorsium bakteri kemudian akan dihitung melalui perubahan pengujian viabilitas konsorsium bakteri ditentukan melalui kurva pertumbuhan konsorsium bakteri tercemar kromium lalu dibandingkan dalam media *nutrient broth* tanpa krom, perhitungan pertumbuhannya dilakukan dengan

membuat kurva standar dan kurva tumbuh dengan tahapan sama seperti metode pembuatan kurva pada isolat tunggal.

3.5.2.10.2 Kuantitas Kandungan Krom

Kandungan krom pada media konsorsium dihitung dengan menggunakan metode DPC untuk mengetahui dan juga mengukur potensi reduksi krom dari setiap konsorsium terhadap kandungan logam krom pada limbah, hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan alat *microplate reader* yang kemudian dihitung dengan menggunakan rumus berikut

$$\text{Persentase Bioremoval} = \frac{H_0 - H_1}{H_0} \times 100\%$$

H₀ = konsentrasi kromium awal

H₁ = konsentrasi kromium akhir

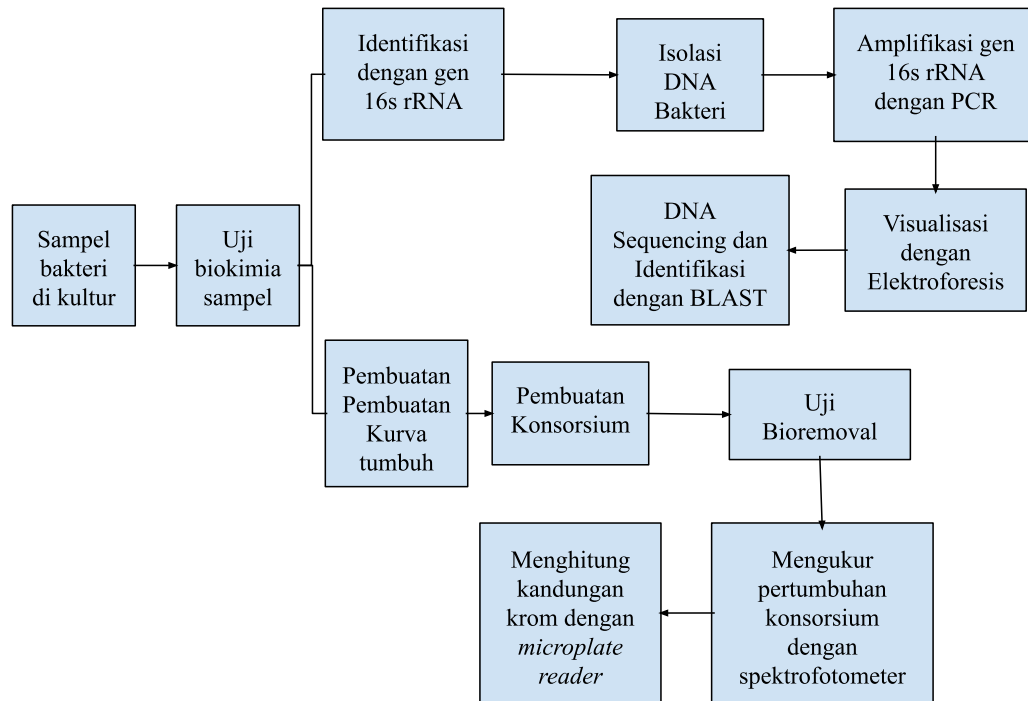
Kandungan krom dihitung dengan *microplate* melalui perbandingan sampel dengan kontrol positif yang berisi media NB dengan kandungan krom 500 ppm, kontrol negatif yang berisi media NB dengan bakteri tanpa campuran krom dan blanko yang berisi media NB saja

3.5.2.11 Analisis data

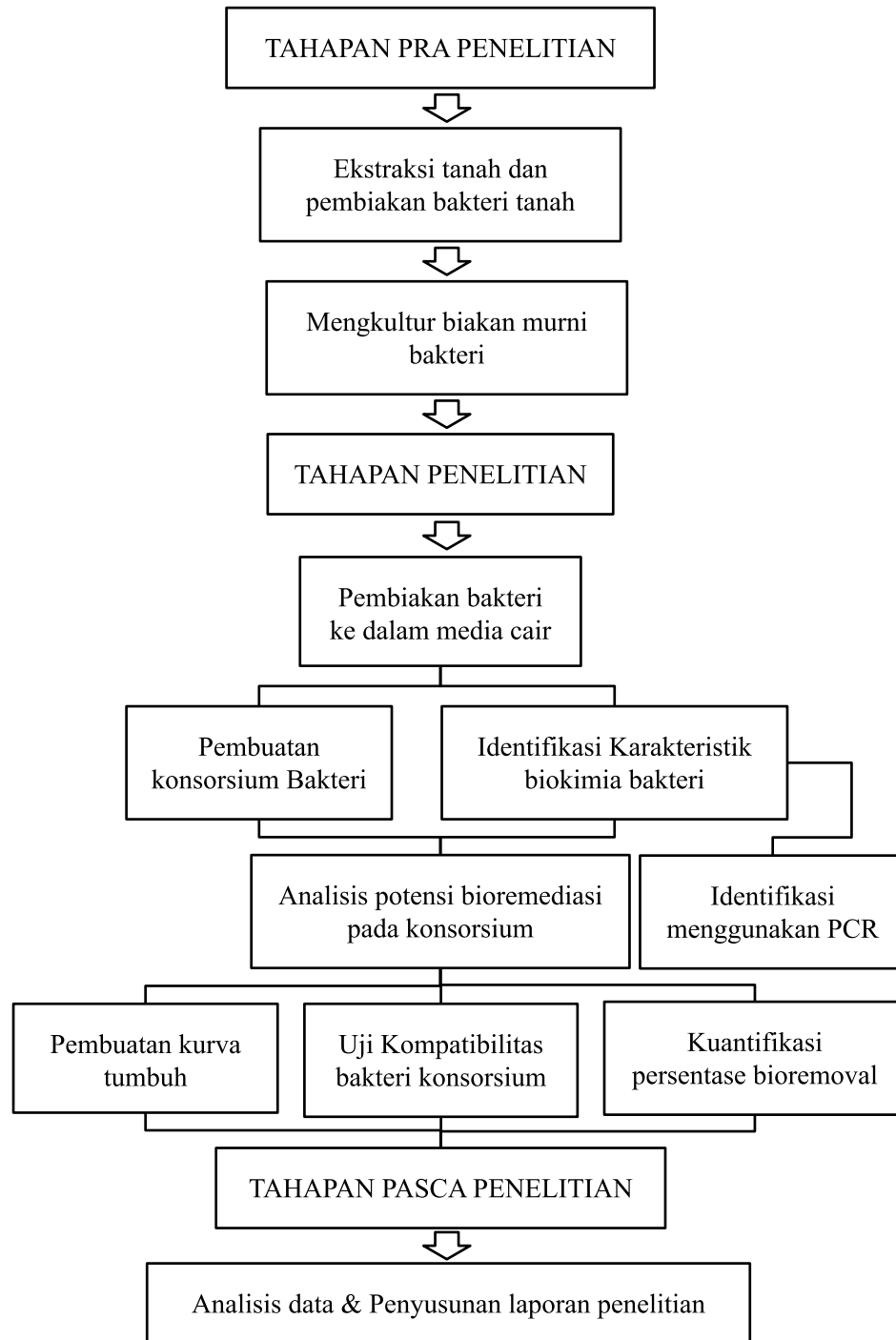
Populasi konsorsium bakteri pada lingkungan tercemar kromium yang ada dalam kurva kemudian dianalisis pada uji statistik untuk mengidentifikasi adanya perbedaan signifikan antara rata-rata pada setiap sampel yang diuji pada penelitian ini, uji dilakukan dengan menggunakan uji non-parametrik Friedman dan uji Kruskal - Wallis untuk melihat adanya perbedaan hasil bioremediasi pada setiap konsorsium bakteri.

3.6 Diagram Alir Penelitian

Berikut diagram alir untuk alur pengerjaan (Gambar 3.3) dan alur penelitian (Gambar 3.4) yang dilakukan



Gambar 3.3 Diagram alir alur pengerjaan



Gambar 3.4 Diagram alir penelitian