

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan deskriptif dan eksperimental secara terintegrasi untuk memperoleh data empiris sekaligus memberikan gambaran menyeluruh mengenai karakteristik dan efektivitas bakteri dalam bioremediasi logam krom. Metode deskriptif digunakan untuk menggambarkan secara sistematis dan faktual karakteristik morfologi, fisiologi, serta kemampuan resistensi isolat bakteri terhadap logam krom. Data mencakup identifikasi koloni, pewarnaan Gram, bentuk sel, uji biokimia, serta hasil analisis molekuler melalui sekuensing gen 16S rRNA dan pemetaan filogenetik guna menentukan kekerabatan antar spesies. Seluruh hasil disajikan secara naratif dan visual (tabel dan gambar) tanpa manipulasi variabel (Creswell & Creswell, 2022).

Sementara itu, metode eksperimental digunakan untuk mengukur efektivitas bioremoval logam krom oleh empat formula konsorsium bakteri yang telah diidentifikasi. Bakteri ditanam pada media cair mengandung 500 ppm kromium, lalu diukur konsentrasi logam sebelum dan sesudah 14 jam inkubasi menggunakan microplate reader pada 540 nm. Efisiensi dihitung dari selisih konsentrasi awal dan akhir. Desain ini memungkinkan pengujian hubungan sebab-akibat antara komposisi konsorsium dan efektivitas bioremoval, serta analisis statistik (uji normalitas, homogenitas, ANOVA, dan Duncan's Multiple Range Test) untuk menguji signifikansi antar perlakuan. Meskipun kuat secara internal, metode eksperimental memiliki keterbatasan dalam hal generalisasi karena dilakukan dalam kondisi laboratorium terkontrol (Shadish *et al.*, 2019).

3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen *posttest-only control group* dengan rancangan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain ini dipilih karena seluruh perlakuan dilakukan dalam kondisi lingkungan yang homogen dan terkendali, tanpa perlu pengelompokan berdasarkan karakteristik tertentu. Dalam desain *posttest-only*, penilaian hanya dilakukan setelah perlakuan diberikan sehingga efek perlakuan dapat diamati secara langsung tanpa adanya pengaruh dari

pengukuran awal (*pretest*). Desain ini memungkinkan peneliti mengukur pengaruh perlakuan pada eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol namun tidak dapat menentukan sejauh mana atau seberapa besar perubahannya terjadi karena di awal tidak dilakukan pretest untuk menentukan data awal (Masturoh, 2018). Dalam penelitian ini, digunakan tiga kelompok, di antaranya:

1. Kelompok Kontrol: media, durasi inkubasi, dan konsentrasi logam kromium dalam media.
2. Kelompok Bebas: kombinasi bakteri pada konsorsium.
3. Kelompok Terikat: persentase bioremoval krom, kompatibilitas antar bakteri pada konsorsium, dan pertumbuhan bakteri dalam konsorsium berdasarkan durasi inkubasi.

Tabel 3. 1 Rancangan Kombinasi Konsorsium

Konsorsium	Kombinasi		
	Formula 1 (F1)	A4	A6
Formula 2 (F2)	A4	A6	
Formula 3 (F3)	A4		B1
Formula 4 (F4)		A6	B1

Jumlah pengulangan pada penelitian ini ditetapkan dengan menggunakan rumus Federer (1977) sebagai berikut :

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

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Keterangan

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dikerjakan mulai dari bulan November hingga April 2025 di Laboratorium Riset Lingkungan Program Studi Biologi Fakultas Pendidikan

Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Berikut merupakan alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian. Adapun rancangan anggaran biaya yang diperlukan pada penelitian terdapat pada **Lampiran 1**.

3.5 Prosedur Penelitian

Tahap persiapan dan tahap penelitian merupakan dua tahap penting dalam membentuk prosedur dalam penelitian ini.

3.5.1 Tahap Persiapan

Tahap persiapan dilakukan sebelum tahap penelitian untuk mempersiapkan segala kebutuhan penelitian diantaranya sterilisasi alat dan bahan juga pembuatan media pertumbuhan bakteri yang akan digunakan selama tahap penelitian berlangsung.

3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan disterilkan dengan dibungkus menggunakan kertas, kemudian ditambahkan lapisan plastik tahan panas, dan selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm (McDonnell & Hansen, 2021).

3.5.1.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Isolat Bakteri

Media untuk pertumbuhan bakteri terdiri atas media *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), dan media selektif dengan penambahan kromium dalam bentuk $K_2Cr_2O_7$. Media NA dibuat dengan melarutkan serbuk NA sebanyak 40 gram ke dalam 1 liter aquades di labu Erlenmeyer, kemudian dipanaskan dan diaduk hingga homogen menggunakan *hot plate stirrer* (Syulasmi *et al.*, 2021). Langkah yang sama dilakukan untuk membuat media NB, tetapi tanpa penambahan agar. Setelah itu, media tersebut disterilkan.

3.5.2 Tahap Penelitian

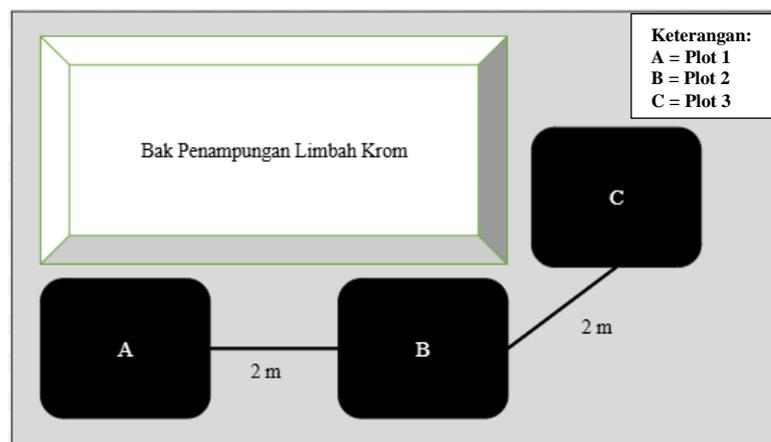
Tahap penelitian mencakup diantaranya pembuatan subkultur isolat murni, identifikasi spesies bakteri melalui uji aktivitas biokimia dan gen 16S rRNA, uji

kompatibilitas konsorsium, pembuatan kurva tumbuh konsorsium bakteri, pengukuran bioremoval logam krom, dan analisis data.

3.5.2.1 Pengambilan Sampel Tanah Rizosfer



Gambar 3. 1 Lokasi pengambilan sampel
(Sumber: Google Earth)



Gambar 3. 2 Plot Pengambilan Sampel
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Sampel tanah diperoleh dari lokasi yang terkontaminasi logam krom di sekitar area bak penampungan limbah krom, tepatnya di Jalan Jendral Sudirman, Kabupaten Garut. Lokasi pengambilan sampel ditunjukkan pada Gambar 3. 1, dengan metode penentuan titik sampel menggunakan sistem plot. Sebanyak tiga plot digunakan (Gambar 3. 2), masing-masing berukuran minimal 1x1 meter, sesuai dengan metode yang dikemukakan oleh (Sumantri & Rahmani, 2020).

Pengambilan sampel dilakukan di area yang ditumbuhi vegetasi, dengan tanah yang diambil berasal dari zona rizosfer tanaman dominan pada lokasi

Ok Muhammad Abthal Al Wafi, 2025

BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM MENGGUNAKAN KOMBINASI FORMULA KONSORSIUM BAKTERI *Bacillus linechiformis*, *Bacillus paralicheniformis*, DAN *Brevibacillus borstelensis* SECARA IN VITRO

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

tersebut. Sampel diambil hingga kedalaman 30 cm dengan jumlah 150 gram menggunakan soil corer dan pipa PVC yang telah dimodifikasi. Selain itu, parameter abiotik tanah pada tiap plot juga diukur, meliputi pH dan kelembaban menggunakan soil tester, serta suhu menggunakan termometer tanah. Seluruh sampel kemudian dimasukkan ke dalam kantong ziplock steril dan dibawa ke Laboratorium Riset Lingkungan FPMIPA UPI untuk analisis lebih lanjut.

3.5.2.2 Isolasi Bakteri Tanah dan Seleksi bakteri Resisten Krom

Bakteri diisolasi dari tanah rizosfer yang telah tercemar logam berat kromium. Sebelum proses pengenceran dilakukan, larutan stok disiapkan dengan mencampurkan 1 gram tanah ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan akuades steril hingga mencapai volume 10 mL. Pengenceran serial dilakukan dari 10^{-1} hingga 10^{-10} , dengan setiap tahapan homogenisasi menggunakan vortex, di mana 1 mL larutan dari tiap tingkat pengenceran dipindahkan ke tabung berisi 9 mL akuades steril. Sampel dari pengenceran 10^{-5} hingga 10^{-10} digunakan untuk proses isolasi, di mana sebanyak 10 μ L dari setiap pengenceran diinokulasikan ke media Nutrient Agar (NA) yang telah ditambahkan $K_2Cr_2O_7$ sebanyak 0,1 mg/L. Sampel kemudian diratakan menggunakan spreader kaca dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 18 jam. Setelah masa inkubasi, koloni bakteri diamati secara visual untuk mengevaluasi perbedaan karakteristik morfologi makroskopis, dan koloni dengan populasi dominan dari setiap sampel dipilih untuk proses lanjutan. Metode isolasi ini merujuk pada pendekatan yang digunakan dalam studi sebelumnya mengenai kemampuan bakteri rizosfer dalam mereduksi kromium dari lingkungan tercemar (Liu *et al.*, 2010). Identifikasi koloni dilakukan berdasarkan variasi bentuk, warna, tepian, ukuran, serta elevasi koloni (Cappuccino & Sherman, 2013).

3.5.2.3 Pembuatan Kultur Isolat Murni

Proses pembuatan kultur isolat murni dilakukan untuk memastikan keaslian dan kemurnian spesies mikroorganisme yang ingin diteliti. Kultur murni dapat diperoleh dengan cara mengambil 1 ose isolat dari cawan petri dan menumbuhkannya pada media agar miring steril. Media yang digunakan harus sesuai dengan kebutuhan nutrisi spesifik dari mikroorganisme yang diisolasi. Setelah inokulasi, kultur tersebut diinkubasi pada suhu optimal sekitar $37^\circ C$ selama 24–48 jam untuk memungkinkan pertumbuhan mikroba yang optimal (Müller *et*

al., 2020). Setelah waktu inkubasi, kultur yang dihasilkan harus diperiksa untuk memastikan bahwa tidak ada kontaminasi dan bahwa kultur tersebut benar-benar merupakan kultur murni dari isolat yang diinginkan.

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

3.5.2.5 Identifikasi Bakteri secara Mikroskopis

Pewarnaan bakteri merupakan salah satu teknik dasar untuk mempermudah pengamatan morfologi dan struktur bakteri di bawah mikroskop. Teknik pewarnaan memungkinkan diferensiasi antara kelompok bakteri berdasarkan karakteristik dinding sel, kapsul, dan keberadaan endospora. Dengan melakukan pewarnaan, peneliti dapat memperoleh informasi awal mengenai jenis dan sifat bakteri yang diamati. Dalam penelitian ini, dua metode pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Keduanya penting dilakukan sebagai klasifikasi awal untuk membedakan bakteri yang akan diuji (Zhou *et al.*, 2024).

3.5.2.5.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan teknik penting dalam identifikasi bakteri, yang bertujuan untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif berdasarkan karakteristik dinding selnya (Madigan *et al.*, 2019). Proses ini diawali dengan mengambil satu koloni bakteri dari media kultur, kemudian dioleskan ke kaca objek. Sampel tersebut diberi pewarna *crystal violet* selama satu menit, lalu dibilas dengan air. Selanjutnya, ditambahkan larutan iodine selama satu menit sebagai mordant, lalu kembali dibilas. Proses dilanjutkan dengan penambahan alkohol 95% sebagai zat dekolorisasi hingga kaca objek tampak bersih, kemudian dibilas lagi.

Pewarna kontras safranin diteteskan selama 45 detik dan dibilas, lalu preparat dikeringkan dengan kertas tisu. Sampel yang telah kering kemudian diamati di bawah mikroskop. Hasil pewarnaan akan menunjukkan warna ungu untuk bakteri gram positif, dan merah muda atau merah untuk bakteri gram negatif (Tortora *et al.*, 2019).

3.5.2.5.2 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora merupakan metode khusus dalam mikrobiologi untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam membentuk endospora, yaitu struktur dorman yang berperan penting dalam mempertahankan kelangsungan hidup bakteri di bawah kondisi lingkungan ekstrem (Madigan *et al.*, 2019). Prosedur ini diawali dengan pengambilan satu koloni bakteri dari media kultur, kemudian dibuat preparat di atas kaca objek. Pewarnaan dilakukan menggunakan malachite green sebagai pewarna utama, di mana preparat dipanaskan dengan uap panas selama kurang lebih lima menit agar pewarna dapat masuk ke dalam endospora. Setelah proses pemanasan, preparat dibilas dengan air dan kemudian diberi pewarna kontras berupa safranin selama 30 detik. Preparat kemudian dibilas kembali, dikeringkan, dan diamati di bawah mikroskop. Endospora akan tampak berwarna hijau, sedangkan sel vegetatifnya akan tampak berwarna merah muda (Tortora *et al.*, 2019).

3.5.2.6 Identifikasi Bakteri Resisten Logam Krom

Identifikasi bakteri resisten logam krom dilakukan untuk mengetahui identitas dan potensi mikroba tersebut dalam mendegradasi atau mengakumulasi logam berbahaya yang dapat dimanfaatkan dalam teknologi pemulihan lingkungan. Proses identifikasi dilakukan melalui pendekatan fenotipik dan molekuler. Pendekatan fenotipik dilakukan melalui uji aktivitas biokimia, sedangkan pendekatan molekuler dilakukan melalui identifikasi gen 16S rRNA untuk mengidentifikasi keberadaan gen-gen yang berperan dalam mekanisme resistensi (Hussain & Al-Saadi, 2021).

3.5.2.6.1 Identifikasi Bakteri Menggunakan Uji Biokimia

Bakteri yang telah diperoleh dari kultur murni selanjutnya diidentifikasi untuk menentukan genusnya dengan menggunakan serangkaian uji biokimia. Uji ini menjadi metode penting dalam identifikasi karena sebagian besar bakteri tidak

memiliki karakteristik morfologi yang cukup spesifik untuk membedakan genus maupun spesiesnya. Oleh karena itu, uji biokimia diperlukan guna mengevaluasi aktivitas metabolik dan enzimatis spesifik dari masing-masing bakteri, yang menjadi dasar pengelompokan taksonomi pada tingkat genus. Beberapa uji aktivitas biokimia bakteri yang akan dilakukan, antara lain:

a. Uji Hidrolisis Pati

Uji hidrolisis pati merupakan metode untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim α -amilase, yang berperan mendegradasi pati menjadi oligosakarida dan glukosa melalui pemutusan ikatan glikosidik α -1,4 (Souza & Magalhães, 2010). Proses ini diawali dengan preparasi media agar pati yang disterilisasi menggunakan autoklaf pada 121°C selama 15 menit, kemudian diinokulasi dengan bakteri menggunakan metode *streak* garis tunggal dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Penambahan larutan Lugol setelah inkubasi akan mengikat pati yang tidak terhidrolisis membentuk kompleks biru-ungu, sementara zona bening di sekitar koloni menunjukkan aktivitas amilolitik (Abduh *et al.*, 2023). Temuan terbaru menegaskan bahwa seleksi strain bakteri melalui uji hidrolisis pati tidak hanya merefleksikan kapasitas metabolik, tetapi juga mengidentifikasi enzim dengan karakteristik unik untuk aplikasi spesifik (Msarah *et al.*, 2020).

b. Uji Hidrolisis Lipid

Uji hidrolisis lipid merupakan metode penting untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim lipase, yang mengkatalisis pemecahan trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas—proses esensial dalam metabolisme lipid mikroorganisme. Dalam praktiknya, bakteri diinokulasi pada media agar yang mengandung trigliserida dan pewarna indikator, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Keberhasilan hidrolisis lipid ditunjukkan oleh perubahan warna atau zona bening di sekitar koloni, yang mencerminkan aktivitas lipase (Rizky *et al.*, 2018).

c. Uji Hidrolisis Kasein

Uji hidrolisis kasein merupakan metode penting untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam mendegradasi protein melalui produksi enzim

protease ekstraseluler. Dalam uji ini, bakteri ditanam pada media agar yang mengandung kasein sebagai sumber protein, lalu diinkubasi selama 24–48 jam pada suhu optimal (sekitar 37°C). Keberhasilan uji ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri, yang menunjukkan degradasi kasein menjadi senyawa lebih sederhana seperti peptida dan asam amino akibat aktivitas enzim protease. Kasein, sebagai protein utama dalam susu, berbentuk fosfoprotein yang membentuk suspensi koloid berwarna putih di media padat, sehingga zona bening akibat aktivitas proteolitik dapat diamati dengan jelas (Utami, 2022).

d. Uji Hidrolisis Gelatin

Uji hidrolisis gelatin merupakan metode untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam memecah gelatin melalui produksi enzim gelatinase. Prosedur uji ini biasanya menggunakan media yang mengandung gelatin, di mana bakteri diinokulasikan dengan jarum ose dan kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, media disimpan di kulkas selama 30 menit untuk mengamati perubahan fisik media. Jika media tetap cair setelah pendinginan, hal ini menunjukkan bahwa bakteri mampu menghidrolisis gelatin, karena enzim gelatinase memecah protein gelatin menjadi bentuk yang tidak dapat membeku pada suhu rendah. Hal ini menandakan aktivitas enzimatik yang efektif dari bakteri tersebut. Selain itu, inkubasi selama 24 jam pada suhu optimal 37°C memungkinkan produksi enzim yang cukup untuk memecah gelatin secara signifikan (Tortora *et al.*, 2019).

e. Uji Katalase

Uji katalase merupakan metode penting dalam mikrobiologi untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang menghasilkan enzim katalase. Enzim ini berfungsi menguraikan hidrogen peroksida (H₂O₂), yang merupakan produk metabolisme aerobik dan bersifat toksik, menjadi air (H₂O) dan oksigen (O₂), sehingga melindungi sel bakteri dari kerusakan oksidatif (Fadli *et al.*, 2022; Pratama & Febriyanti, 2020s). Prosedur uji katalase dilakukan dengan mengambil sebagian koloni bakteri dan meneteskan larutan H₂O₂ (biasanya 3% atau 28%) pada koloni tersebut. Jika

bakteri memiliki enzim katalase, akan terjadi reaksi penguraian H_2O_2 yang menghasilkan gelembung oksigen sebagai tanda positif (Asri *et al.*, 2022; Puspita *et al.*, 2020). Gelembung ini merupakan indikator visual langsung bahwa bakteri mampu memecah H_2O_2 melalui aktivitas enzim katalase (Annisa *et al.*, 2019; Rani *et al.*, 2023).

f. Uji Produksi H_2S

Uji produksi H_2S digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan H_2S kemampuan untuk mereduksi senyawa sulfur menjadi H_2S . Uji H_2S dilakukan dengan menggunakan media yang mengandung Ferrous Ammonium Sulfat dan Natrium Tiosulfat, sebagai indikator H_2S , 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 H_2S oleh bakteri (Darkoh *et al.*, 2015).

g. 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 (Darkoh *et al.*, 2015).

h. 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 (Eruchalu, 2024).

i. 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 29 bakteri dengan menggunakan lub ose, kemudian diinkubasi selama 24 jam, setelah itu

diberikan 3 tetes *methyl red* sebagai indikator, indikator positif jika terjadi perubahan warna media menjadi warna merah setelah diberikan tetesan metil red (Stiles & Ng, 1981).

j. 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 *acetyl methyl carbinol* 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 (Stiles & Ng, 1981).

k. Uji Utilisasi Nitrat

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 (Lammert, 2007).

l. 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 30 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 (Lammert, 2007).

m. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat digunakan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat, pada penelitian ini karbohidrat yang digunakan adalah laktosa, sukrosa dan dekstrosa, uji dilakukan dengan menggunakan media cair yang mengandung karbohidrat yang diuji dan pewarna 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 (Lammert, 2007).

3.5.2.6.2 Identifikasi Bakteri Menggunakan Gen 16S rRNA

a. Isolasi DNA bakteri tunggal

Isolasi DNA bakteri dilakukan dengan metode *boiling* (pendidihan). Sampel biakan bakteri yang telah diinkubasi dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml kemudian ditambahkan 1 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 1x. Campuran tersebut disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 3 menit dan supernatan dibuang menyisakan pelet pada bagian dasar tabung. Pelet ditambahkan TE 1x sebanyak 100 µl kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Tabung 1,5 ml disimpan di dalam penangas pada suhu 100°C selama 10 menit, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Lisat yang terdapat pada tabung kemudian dipindahkan ke tabung yang baru dan ditambahkan 100 µl TE 1x yang sebelumnya disimpan di kulkas. Hasil isolasi DNA disimpan pada suhu 20°C (modifikasi Yanez *et al.*, 2003). Proses pemanasan dengan suhu tinggi (100°C) pada saat isolasi bertujuan untuk meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga dinding sel dan membran sel menjadi lisis (Sunarno, 2013). Proses isolasi DNA dengan metode *boiling* merupakan salah satu metode isolasi DNA yang sederhana. Prinsip isolasi metode *boiling* yaitu menghancurkan sel dengan memberikan gangguan fisik berupa pemanasan dengan suhu tinggi yaitu 95-100°C. Isolasi DNA bakteri dengan metode

boiling ini juga digunakan dalam penelitian Gitaswari & Budayanti (2019), Apriliani & Pinatih (2017), dan Afif & Putri (2019).

b. Amplifikasi Gen 16S rRNA

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan menggunakan primer universal 27F dan 1492R yang menargetkan daerah konservatif dari gen 16S rRNA. Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 40 μ L, yang terdiri atas 20 μ L GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 μ L primer 27F (10 pM), 1 μ L primer 1492R (10 pM), 18 μ L nuclease-free water, serta sedikit koloni bakteri sebagai sumber DNA. Proses PCR dijalankan selama 30 siklus menggunakan alat *thermal cycler* Veriti 96 Well Fast (Applied Biosystems) dengan kondisi: pra-denaturasi pada 94°C selama 5 menit; denaturasi pada 94°C selama 1 menit; annealing pada 55°C selama 1 menit; elongasi pada 72°C selama 1 menit; dan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Hasil PCR kemudian disimpan pada suhu 4°C untuk keperluan analisis lebih lanjut (Dinoto *et al.*, 2020).

c. Elektroforesis hasil PCR

Hasil amplifikasi produk PCR kemudian divisualisasikan melalui elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% (b/v) yang diwarnai dengan SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific). *Marker* DNA yang digunakan adalah DNA *ladder* 1 Kb (Geneaid) untuk memperkirakan ukuran ampikon yang dihasilkan. Pita DNA yang muncul pada kisaran \pm 1500 bp menunjukkan keberhasilan amplifikasi gen 16S rRNA (Dinoto *et al.* 2020).

d. Sekuensing DNA

Proses sekuensing dilakukan dengan metode Sanger yang dimodifikasi menggunakan sistem kapiler otomatis (*Automated Capillary Sequencer*). Reaksi diawali dengan penambahan satu primer spesifik (primer *forward* atau *reverse*), DNA templat, enzim DNA polimerase, deoksinukleotida (dNTPs), dan dideoksinukleotida berlabel fluoresen (ddNTPs). ddNTP tidak memiliki gugus hidroksil 3' yang diperlukan untuk perpanjangan rantai DNA, sehingga ketika secara acak terintegrasi, sintesis DNA terhenti. Reaksi sekuensing menghasilkan campuran fragmen DNA dengan panjang

berbeda yang masing-masing berakhir pada salah satu dari empat ddNTP yang diberi label warna berbeda. Fragmen DNA hasil reaksi kemudian dipisahkan berdasarkan ukurannya melalui elektroforesis kapiler yang terintegrasi dalam sistem mesin. Pemisahan ini memungkinkan deteksi urutan basa secara akurat karena setiap ddNTP menghasilkan sinyal fluoresen spesifik saat melewati laser dalam kapiler. Sinyal fluoresen yang dihasilkan dari tiap fragmen kemudian direkam dan dianalisis oleh perangkat lunak sistem. Hasil visualisasi ditampilkan dalam bentuk elektroferogram, berupa puncak-puncak warna yang mewakili urutan basa nukleotida pada fragmen DNA (Brookes, 2023). Informasi urutan tersebut selanjutnya digunakan untuk keperluan analisis bioinformatika dan identifikasi spesies.

3.5.2.7 Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri

Pembuatan kurva tumbuh isolat bakteri diadaptasi dari penelitian Zahroh (2018), bahwa isolat bakteri yang resisten terhadap logam krom ditumbuhkan pada media *nutrient Broth* (NB) tanpa penambahan krom dan dengan penambahan krom 500 ppm untuk membuat kurva pertumbuhannya. Satu ose isolat dari kultur diinokulasikan secara aseptis ke dalam 30 mL medium NB, lalu diinkubasi selama 24 hingga 48 jam pada suhu 37°C dalam inkubator dan di-*shake* selama 10 menit menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm di setiap sebelum dan sesudah inkubasi. Pengukuran dilakukan selama 24 jam dan nilai absorbansi diukur tiap 2 jam menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Dari kurva pertumbuhan bakteri pada media NB tanpa krom dapat diketahui umur perlakuan isolat untuk pembuatan konsorsium, yang dihitung dengan rumus berikut:

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

Keterangan:

μ = umur kultur yang akan diberi perlakuan;

a = waktu fase log akhir;

b = waktu fase log awal.

3.5.2.8 Pembuatan Konsorsium Bakteri

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

botol kultur 25 mL sebanyak jumlah kombinasi formula konsorsium dan pengulangan yang telah diisi NB, kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Bakteri diinokulasikan pada media NB dan di-*shake* selama 10 menit sebelum diinkubasi dalam inkubator selama umur perlakuan yang diperoleh dari kurva tumbuh bakteri. Absorbansi diukur pada OD = 0,2 dengan panjang gelombang 540 nm pada spektrofotometer. Jika nilai OD yang terukur melebihi 0,2, dilakukan pengenceran dengan NB. Pengenceran untuk mendapatkan OD = 0,2 dilakukan dengan rumus:

$$n_1 \times V_1 = n_2 \times V_2$$

Keterangan:

n_1 = OD suspensi awal

n_2 = OD yang ditentukan

V_1 = volume suspensi awal

V_2 = volume total hasil pengenceran

Setelah suspensi bakteri mencapai umur perlakuan (μ), nilai OD diukur pada 600 nm. Setiap bakteri dalam formulasi konsorsium dengan OD = 0,2 diinokulasikan dalam botol kultur sebanyak 2 mL dengan perbandingan setiap bakteri 1:1 untuk kombinasi formula yang terdiri dari 2 bakteri, sedangkan kombinasi formula yang terdiri dari tiga bakteri menggunakan perbandingan 0.67:0.67:0.67 dalam media NB 20 mL yang mengandung 500 ppm logam krom dan media kontrol yang tidak mengandung logam krom. Konsorsium tersebut di-*shake* pada kecepatan 120 rpm selama 10 menit sebelum dan setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 14 jam. Proses remediasi logam krom oleh konsorsium dapat diketahui dengan membandingkan konsorsium dalam media NB dengan tambahan kromium dan tanpa tambahan kromium. Pertumbuhan konsorsium tersebut dapat dilihat melalui perhitungan kurva tumbuh setiap konsorsium yang dilakukan seperti pada kurva tumbuh bakteri (Metode 3.6.2.7).

3.5.2.9 Uji Kompatibilitas Konsorsium

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

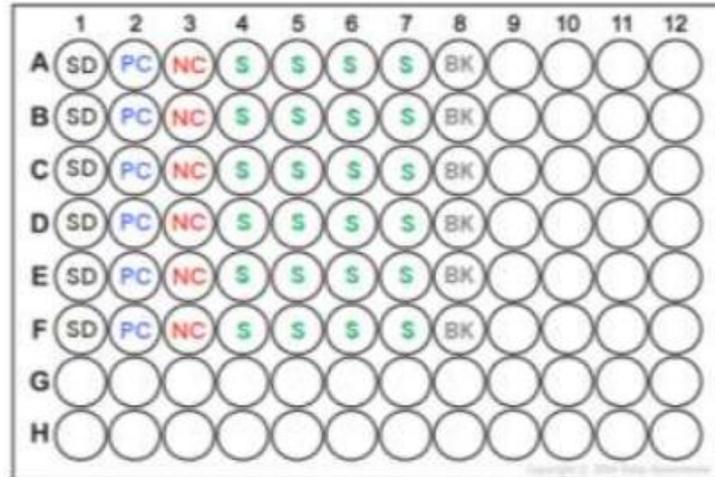
garis tersebut. Konsorsium bakteri dianggap kompatibel jika tidak terdapat zona penghambatan di antara isolat bakteri (Sarkar & Chourasia, 2018). Interaksi ini dilihat dari keberadaan zona hambat dan ukurannya (Balouiri, 2016). Zona hambat atau lisis diamati pada titik perpotongan antar garis (Al-Daghari *et al.*, 2023). Adanya zona hambat atau lisis menunjukkan interaksi antagonisme antar bakteri, sedangkan tidak adanya zona ini mengindikasikan sinergisme (Ethica *et al.*, 2020).

3.5.2.10 Pengukuran Bioremoval Logam Krom

Kultur konsorsium bakteri pada media NB-Cr diukur konsentrasi logam krom sebelum dan sesudah 12 jam menggunakan *microplate reader*. Prinsip kerja *microplate reader* adalah mendeteksi absorbansi, fluoresensi, atau luminesensi sampel dalam setiap sumur *microplate* untuk memperoleh data kuantitatif pada berbagai panjang gelombang. Dalam analisis absorbansi, seperti pada pengukuran konsentrasi logam krom, *microplate reader* memancarkan cahaya pada panjang gelombang yang diatur (540 nm untuk analisis dengan reagen DPC). Ketika cahaya melewati sampel, sebagian cahaya diserap, dan bagian lainnya diteruskan. Sensor mendeteksi intensitas cahaya yang diteruskan dan menghitung absorbansi berdasarkan perbedaan antara cahaya yang dipancarkan dan yang diteruskan, menghasilkan nilai yang sebanding dengan konsentrasi zat yang diukur (Gonzalez & Aston, 2017; Baker *et al.*, 2018). Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang tertentu memberikan informasi tentang konsentrasi zat dalam sampel karena hubungan linier antara konsentrasi dan absorbansi, sesuai dengan hukum Beer-Lambert Analisis kolorimetri untuk krom dilakukan dalam mikroplate menggunakan reagen DPC, dengan mengukur absorbansi menggunakan mikroplate reader. Dalam mikroplate terdapat standar, blanko, kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan sampel. Blanko dan standar menggunakan media NB. Kontrol positif terdiri dari media dengan penambahan krom tanpa konsorsium bakteri, sedangkan kontrol negatif terdiri dari media dengan konsorsium tanpa krom.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Hagiri *et al.* (2024), disebutkan bahwa setiap sumur *microplate* terdiri dari 20 μL reagen 1,5-diphenylcarbazine (DPC), 20 μL 1,5 mol/L asam sulfat (H_2SO_4), dan 300 μL sampel yang akan diuji. Akan tetapi dilakukan penyesuaian jumlah bahan yang digunakan karena pertimbangan akan kelebihan jumlah larutan di tiap sumurnya. Maka setiap sumur

microplate terdiri dari 13 μL reagen 1,5-diphenylcarbazide (DPC), 13 μL 1,5 mol/L asam sulfat (H_2SO_4), dan 200 μL sampel yang akan diuji. Larutan DPC dibuat dengan melarutkan 8 gram DPC dalam 1 liter etanol. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm setelah pencampuran larutan selama 5-15 menit.



Gambar 3. 3 Skema Layout Microplate

(Keterangan: Sd: Standar; PC: Kontrol Positif; NC: Kontrol Negatif; S: Sampel; BK: *Blanko*)

(Sumber: measurebiology.org)

Efisiensi penghilangan (*removal*) yang dilakukan oleh konsorsium diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Efisiensi bioremoval} = \frac{H_o - H_s}{H_o} \times 100\%$$

Keterangan:

H_o = konsentrasi logam krom awal

H_s = konsentrasi logam krom akhir

3.5.2.11 Analisis Data

a. SPSS

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa efisiensi bioremoval kromium (Cr) pada media perlakuan konsorsium. Analisis data dilakukan secara kuantitatif menggunakan perangkat lunak SPSS versi 22. Dilakukan uji One Way ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan

Ok Muhammad Abthal Al Wafi, 2025

BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM MENGGUNAKAN KOMBINASI FORMULA KONSORSIUM BAKTERI Bacillus linechiformis, Bacillus paralicheniformis, DAN Brevibacillus borstelensis SECARA IN VITRO

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

antar perlakuan. Apabila hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji lanjutan (post hoc) Duncan's Multiple Range Test (DMRT) untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memberikan perbedaan nyata satu sama lain. Uji ini digunakan untuk mengidentifikasi perlakuan dengan efisiensi bioremoval dan laju pertumbuhan yang paling optimal dalam sistem konsorsium bakteri (Brookes, 2023).

b. Bioedit

Hasil sekuensing dilakukan pembuatan *consensus* menggunakan software Bioedit versi 7.0.4.1 dengan cara menggabungkan (*contig*) sekuens hasil sekuensing *forward* dan *reverse* yang bertujuan pengolahan data setiap basa *consensus*-nya dianalisis dengan melihat puncak (*peak*) pada hasil sekuensing. Data sekuens yang diperoleh disimpan dalam format FASTA pada aplikasi Notepad (Brookes, 2023).

c. BLAST

Hasil *contig* sekuens gen bakteri dilakukan analisis dengan Basic Local Alignment Search Tool *Nucleotide* (BLASTN) di NCBI. Analisis ini dilakukan untuk melihat nilai homologi sekuens gen bakteri dengan sekuens referensi gen yang terdapat di GeneBank NCBI, dengan cara mengunggah *consensus* yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya (Brookes, 2023).

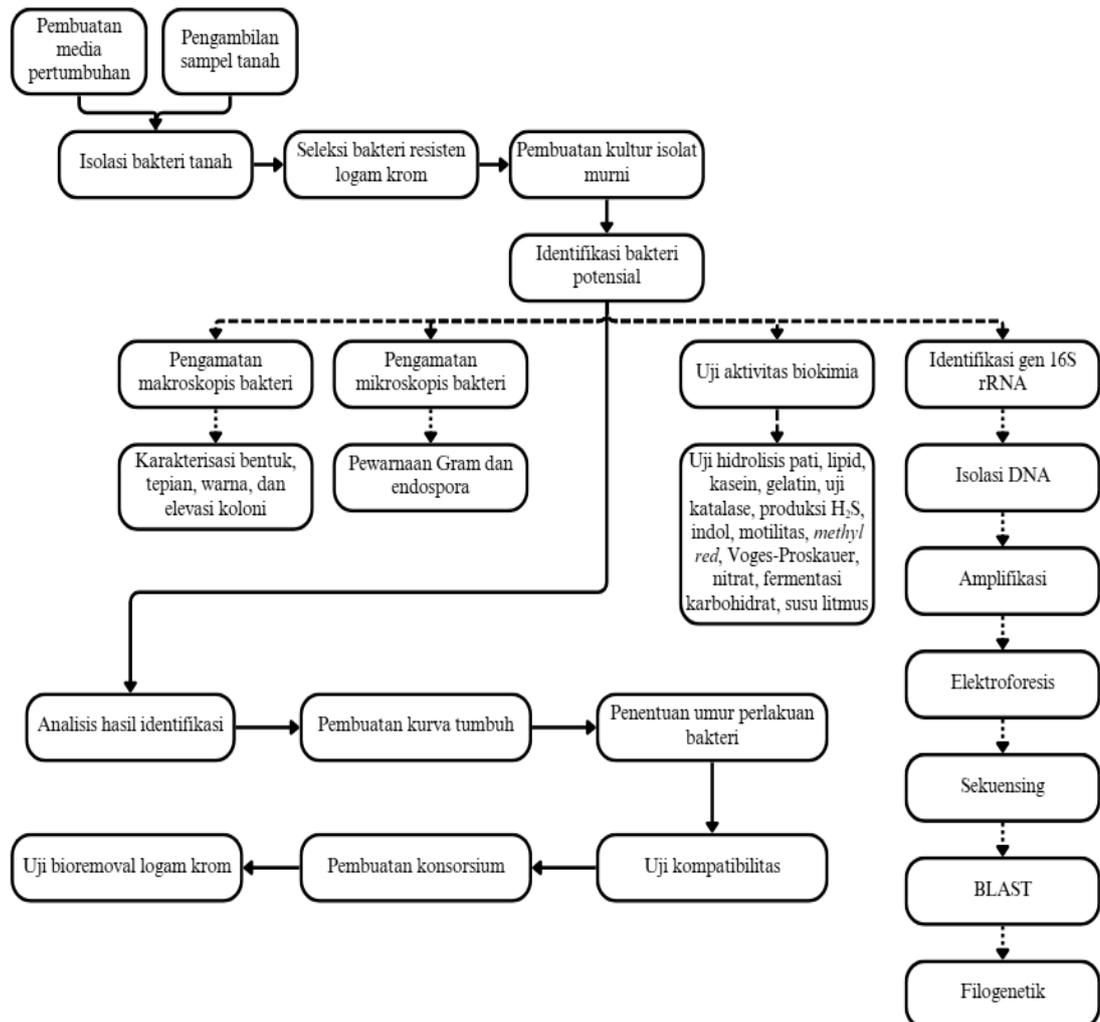
d. Filogenetik

Analisis filogenetik dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara isolat bakteri yang telah diidentifikasi dengan spesies-spesies lain yang terdapat dalam database GenBank NCBI. File sekuens dalam format FASTA yang diperoleh dari proses pembuatan *consensus* kemudian dimasukkan ke dalam perangkat lunak MEGA versi 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Pohon filogenetik dibangun menggunakan metode Neighbor-Joining (NJ) dengan 1000 kali *bootstrap* untuk mengevaluasi keandalan klad yang terbentuk. Proses ini bertujuan untuk memperkuat validitas identifikasi spesies bakteri dan menempatkan isolat dalam konteks evolusi dengan spesies referensi. Hasil analisis divisualisasikan dalam bentuk *dendrogram* yang menunjukkan kedekatan

filogenetik antara isolat bakteri penelitian dengan strain yang telah terdaftar pada database GenBank NCBI (Brookes, 2023).

3.5.2.12 Alur Penelitian

Pada Gambar 3. 4 menunjukkan alur penelitian “Bioremediasi Logam Kromium Menggunakan Kombinasi Formula Konsorsium Bakteri *Bacillus licheniformis*, *Bacillus paralicheniformis*, dan *Brevibacillus borstelensis* secara *in vitro*” sebagai berikut.



Gambar 3. 4 Alur Penelitian