

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif dengan mengidentifikasi isolat bakteri dan fungi, serta menghitung nilai bioakumulasi penyerapan logam krom oleh konsorsium isolat bakteri dan fungi yang resisten terhadap logam krom. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang menjelaskan situasi yang ada seperti menghubungkan suatu hal, beberapa fenomena, atau kondisi tertentu berdasarkan data yang didapatkan (Cheema *et al.*, 2013; Zellatifanny & Mudjiyanto, 2018).

#### **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah isolat bakteri dan fungi hasil isolasi dari rhizosfer tanaman yang diketahui memiliki potensi dalam meremediasi logam krom. Sampel dalam penelitian ini adalah masing-masing isolat bakteri dan fungi yang resisten terhadap logam krom.

#### **3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan dari bulan Februari-Juli tahun 2022 di Laboratorium Riset Lingkungan Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA). Uji *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS) dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah Bandung dan Laboratorium Pengujian Kualitas Lingkungan BINALAB.

#### **3.4 Alat dan Bahan Penelitian**

Alat yang digunakan meliputi alat gelas berupa cawan petri, tabung reaksi, labu erlenmeyer, dll.; alat ukur berupa *soil tester*, *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS), dll.; serta alat lain berupa inkubator, autoklaf, mikroskop, dll. Bahan yang digunakan meliputi bahan reagen berupa reagen Kovac's, Barrits, *methyl red*, dll.; bahan pewarnaan berupa *lactophenol cotton blue*, kristal violet, safranin, dll; serta bahan untuk media berupa agar, NaCl, dll. Alat dan bahan yang digunakan terlampir pada Tabel 1 dan Tabel 2 (Lampiran 1), serta terdapat di Laboratorium Riset Lingkungan Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

### 3.5 Prosedur Penelitian

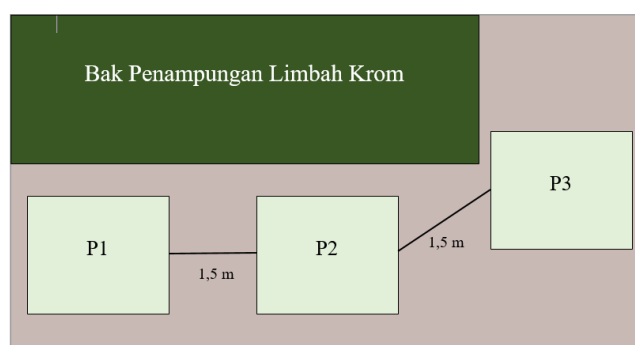
#### 3.5.1 Tahap Persiapan

Tahap persiapan dilakukan untuk menyiapkan dan sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Alat seperti cawan petri, tip mikropipet, dan alat lain yang akan digunakan dalam penelitian, disterilkan dengan cara membungkus alat dengan kertas lalu dimasukkan ke dalam plastik tahan panas (Istini, 2020). Bahan yang akan digunakan dimasukkan ke wadah kaca lalu selanjutnya dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik. Alat dan bahan yang sudah dibungkus kemudian disterilisasi dengan memasukkan ke dalam autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Tujuannya untuk membunuh mikroorganisme beserta endosporanya agar tidak terjadi kontaminasi pada alat bahan yang akan digunakan dalam penelitian (Alqum & Tarsono, 2019).

#### 3.5.2 Tahap Penelitian

##### 3.5.2.1 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 dengan titik pengambilan sampel ditentukan berdasarkan Ellenberg & Dumbois (2016) yaitu ditentukan 3 plot dengan kuadran berukuran minimal 1x1 meter (Gambar 3.1). Sampel tanah diambil dari area rhizosfer tumbuhan dengan jumlah terbanyak setiap jenis tumbuhan yang ada pada 3 plot yang sudah ditentukan, dan jumlah tumbuhan dihitung Index Nilai Penting (INP) untuk melihat dominansi tumbuhan pada lingkungan tersebut (Soerianegara & Indrawan, 2002).



Gambar 3.1 Titik Pengambilan Sampel Tanah

Tanah diambil sebanyak 150 gram pada tanah dengan kedalaman  $\pm 30$  cm di area rhizosfer tumbuhan yang tercemar logam krom dengan jumlah terbanyak berdasarkan hasil perhitungan INP. Faktor abiotik seperti pH dan suhu tanah dihitung pada setiap titik pengambilan sampel. Tanah dimasukkan kedalam plastik steril lalu diberi label dan dibawa ke Laboratorium Riset Lingkungan FPMIPA UPI.

### 3.5.2.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri dan Fungi

Sebanyak 40 gram Nutrien Agar (NA) dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu dilarutkan dalam 1000 mL akuades kemudian dipanaskan hingga homogen. Untuk pembuatan media Nutrien Broth (NB) sama seperti medium NA, hanya mengganti nutrien agar dengan nutrien broth (Syulasma *et al.*, 2005). Sebanyak 39 gram Potato Dextrose Agar (PDA) dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu dilarutkan dalam 1000 mL akuades kemudian dipanaskan hingga homogen dan ditambahkan larutan kloramfenikol sebanyak 100 mg/L. Untuk pembuatan medium Potato Dextrose Broth (PDB) sama seperti medium PDA, hanya mengganti potato dextrose agar dengan potato dextrose broth (Syulasma *et al.*, 2005).

Media Luria-bertani Broth (LB) dibuat dengan mencampurkan 10 g tripton, 5 g *yeast extract*, 5 g NaCl, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu dilarutkan dalam 1000 mL akuades kemudian dipanaskan hingga homogen (Devi *et al.*, 2011). Medium *Yeast Mannitol Broth* (YMB) dibuat dengan mencampurkan 10 g mannitol; 0,5 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ; 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; *yeast extract* 1 g; 0,1 g NaCl, kemudian dilarutkan dengan 1 liter akuades (Adriantama *et al.*, 2021). Media yang sudah dilarutkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL suspensi untuk agar diri dan 3-5 mL suspensi untuk agar miring. Sebanyak 20 mL media dituangkan ke cawan petri. Setelah seluruh bahan larut, media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu  $121^\circ C$  dengan tekanan 1,5 atm (Syulasma *et al.*, 2005).

### 3.5.2.3 Analisis Kandungan Logam

Sampel tanah ditimbang sebanyak 0,5 gram dengan menggunakan neraca analitik. Sampel dimasukkan ke dalam botol dan ditambahkan 15 mL  $HNO_3$  pekat, lalu dipanaskan di dalam oven pada suhu  $140^\circ C$  selama 180 menit hingga hampir kering. Setelah sampel tanah terdestruksi secara sempurna, larutan tersebut didinginkan dan diencerkan hingga 40 mL dengan akuades dan disaring

menggunakan kertas saring 63 mikron yang bertujuan untuk menghindari penyumbatan pipa kapiler pada saat analisis sampel dengan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS). Larutan disimpan dalam botol sampel dan selanjutnya larutan dianalisis kandungan logam kromnya menggunakan alat AAS (Yap *et al.*, 2002).

#### **3.5.2.4 Isolasi Bakteri dan Fungi**

Bakteri dan fungi diisolasi dari tanah rhizosfer yang tercemar logam krom. Sebanyak 1 gr sampel tanah diambil, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades yang telah disterilkan sebagai pengenceran  $10^{-1}$ . Kemudian dari pengenceran  $10^{-1}$  diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL akuades steril untuk pengenceran  $10^{-2}$ . Perlakuan yang sama dilakukan hingga pengenceran  $10^{-7}$ . Sampel pada pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  untuk isolat fungi, pengenceran  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , dan  $10^{-7}$  untuk isolat bakteri. Masing-masing pengenceran diambil sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet lalu ditetaskan pada media NA untuk isolat bakteri dan PDA untuk isolat fungi kemudian diratakan lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  untuk fungi dan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  untuk bakteri (Waluyo, 2008).

#### **3.5.2.5 Pembuatan Biakan Murni**

Biakan murni isolat bakteri dan fungi di subkultur ke media agar miring steril dengan menginokulasikan 1 ose isolat ke dalam media agar miring. Kultur murni tersebut diinkubasi pada suhu  $25^{\circ}$ - $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam (Ed-har *et al.* 2017).

#### **3.5.2.6 Identifikasi Bakteri Resisten Logam Krom**

Identifikasi bakteri dilakukan dengan mengacu pada kunci determinasi buku *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik* (Soemarno, 2000) dan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Identifikasi isolat bakteri dilakukan dengan mengamati morfologi koloni secara makroskopis dan mikroskopis, serta uji aktivitas biokimia bakteri sebagai berikut:

##### **1 Pewarnaan Gram**

Akuades ditetaskan di kaca objek lalu isokulasikan 1 ose biakan bakteri dan difiksasi di atas api. Kristal violet ditetaskan pada sediaan bakteri dan dibiarkan selama 60 detik lalu dicuci dengan akuade. Larutan lugol/iodin ditetaskan dan dibiarkan selama 60 detik. Alkohol 96% ditetaskan selama 30 detik kemudian

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 (Hamdiyati & Kusnadi, 2019).

## 2 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 (Hamdiyati & Kusnadi, 2019; Cappuccino & Welsh, 2020).

## 3 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 37°C. Setelah terdapat pertumbuhan bakteri, media berisi bakteri ditetesi dengan larutan lugol/iodin dan biarkan selama beberapa menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri (Cappuccino, 2019).

## 4 Uji hidrolisis lemak

Isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan ke media lipid agar secara zig-zag atau bentuk lain lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Cappuccino & Welsh, 2020).

## 5 Uji kasein

Isolat bakteri diinokulasikan ke media susu skim agar selama 24-48 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya daerah bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri (Cappuccino & Welsh, 2020).

## 6 Uji hidrolisis gelatin

Isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan sebanyak 1 ose ke dalam media agar dari nutrien gelatin lalu diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 37°C. Kultur isolat bakteri disimpan di lemari pendingin dengan suhu 4°C selama 30

menit. Jika media gelatin tetap cair, maka hasilnya positif telah terjadi hidrolisis gelatin (Yogyaswari *et al.*, 2016; Hamdiyati & Kusnadi, 2019).

#### 7 Uji katalase

Isolat bakteri diinokulasikan pada media NA lalu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Teteskan media dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% sebanyak 3-4 tetes lalu amati ada tidaknya gelembung udara (Hamdiyati & Kusnadi, 2019).

#### 8 Uji produksi H<sub>2</sub>S

Isolat bakteri diinokulasi pada media SIM agar secara aseptik. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada media menjadi hitam/kehitaman setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C disekitar jalur inokulasi (Cappuccino & Welsh, 2020).

#### 9 Uji Indol

Isolat bakteri diinokulasi pada media SIM agar lalu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Media ditetaskan Reagen Kovac's sebanyak 1-2 tetes. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna merah di atas tabung uji (Hamdiyati & Kusnadi, 2019).

#### 10 Uji MR-VP

Bakteri diinokulasikan ke dalam 2 tabung yang berisi media glukosa lalu diinkubasi selama 48 jam. reagen MR ditetskan pada satu tabung dan reagen VP ditetaskan pada tabung lainnya. Reaksi positif uji MR ditandai dengan adanya perubahan media menjadi warna merah sementara reaksi negatif ditunjukkan dengan adanya warna kuning. Reaksi positif pada uji VP ditandai dengan adanya warna merah pada media dan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media (Hamdiyati & Kusnadi, 2019).

#### 11 Uji sitrat

Isolat bakteri diinokulasikan pada media *Simmon's Citrate Agar* miring lalu diinkubasi selama 24-48 jam. Reaksi positif ditandai dengan adanya perubahan warna media dari hijau ke biru, sementara reaksi negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media (Hamdiyati & Kusnadi, 2019).

#### 12 Uji fermentasi karbohidrat

Isolat bakteri diinokulasikan pada kaldu sukrosa, laktosa, dan dekstroza dengan menggunakan tabung durham lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu

37°C. Pastikan tidak ada gelembung ketika tabung Durham dimasukkan. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna kaldu dari ungu menjadi kuning (Yogyaswari *et al.*, 2016).

### 13 Uji motilitas

Biakan bakteri diinokulasikan secara vertikal pada media NA semi solid kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang motil ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan pada media dan tidak ada bekas tusukan atau menyebar ke seluruh media. Sedangkan bakteri yang non motil hanya tumbuh pada daerah tusukan (Panjaitan *et al.*, 2020)

#### 3.5.2.7 Identifikasi Fungi Resisten Logam Krom

Identifikasi isolat fungi mengacu pada kunci determinasi buku *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* (Watanabe, 2002) dan *Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification* (Walsh *et al.*, 2018). Identifikasi isolat fungi dilakukan dengan cara (Cappucino & Welsh, 2020) sebagai berikut:

- 1 Secara makroskopis ciri yang diamati adalah morfologi dan karakteristik koloni.
- 2 Secara mikroskopis ciri yang diamati adalah tipe bentuk spora, jenis sporangia, dan dicocokkan dengan gambar pada literatur.

#### 3.5.2.8 Seleksi Isolat Bakteri dan Fungi Resisten Logam Krom

Isolat bakteri dan fungi yang sudah dibuat biakan murni, kemudian dikultur dalam media NA dan PDA yang telah diberi  $K_2CrO_7$  dengan konsentrasi berdasarkan hasil analisis kandungan logam yang ditemukan pada tanah yaitu dengan rentang 4000-5000 mg/kg. Jika isolat bakteri dan fungi tidak tumbuh atau pertumbuhannya tipis, maka konsentrasi  $K_2CrO_7$  diturunkan hingga konsentrasi yang dapat ditumbuhi oleh isolat bakteri dan fungi. Dilakukan seleksi pada kultur campuran dengan memilih isolat bakteri yang paling baik tumbuh pada konsentrasi logam krom tertinggi, dan untuk isolat fungi dipilih fungi jenis *yeast* yang paling baik tumbuh pada konsentrasi logam krom tertinggi. Isolat terpilih diperbanyak dalam media agar miring dan cawan petri untuk dilakukan uji penyerapan logam krom (Rosariasturi *et al.*, 2012; Amami & Imaningsih, 2019).

### 3.5.2.9 Uji Penyerapan Logam Krom Oleh Konsorsium Bakteri dan Fungi

Pengujian penyerapan logam krom dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri dan fungi terpilih pada media yang ditambahkan logam krom. Media konsorsium bakteri dan fungi berisi 3 isolat bakteri dan 1 isolat fungi atau 1 isolat bakteri dan 2 isolat fungi.

Konsorsium isolat bakteri dan fungi ditumbuhkan pada media YMB (*yeast manitol broth*) yang mengandung konsentrasi logam krom 28 ppm. Sebanyak 100 ml media YMB yang mengandung 28 ppm logam krom dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer 250 ml, kemudian disterilkan. Isolat jamur diinokulasikan ke dalam tabung sebanyak 1 ml pada suspensi  $10^{-6}$  dan di *shaker* pada kecepatan 150 rpm dengan suhu 28°C selama 24 jam (Bandara *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2011). Perhitungan kandungan logam krom yang terakumulasi dilakukan cara yang sama seperti pada media isolat bakteri dan fungi.

### 3.5.2.10 Pengukuran Kandungan Logam Krom Pada Media Konsorsium

#### Bakteri dan Fungi

Kandungan krom pada masing-masing media konsorsium jamur, bakteri, serta bakteri dan fungi diukur pada H0 dan H1. Konsentrasi logam krom yang terdapat pada media konsorsium bakteri dan fungi diukur dengan panjang gelombang 357,9 nm pada *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) (Joshi *et al.*, 2011; Aslam *et al.*, 2020). Persentase bioakumulasi dihitung dengan rumus :

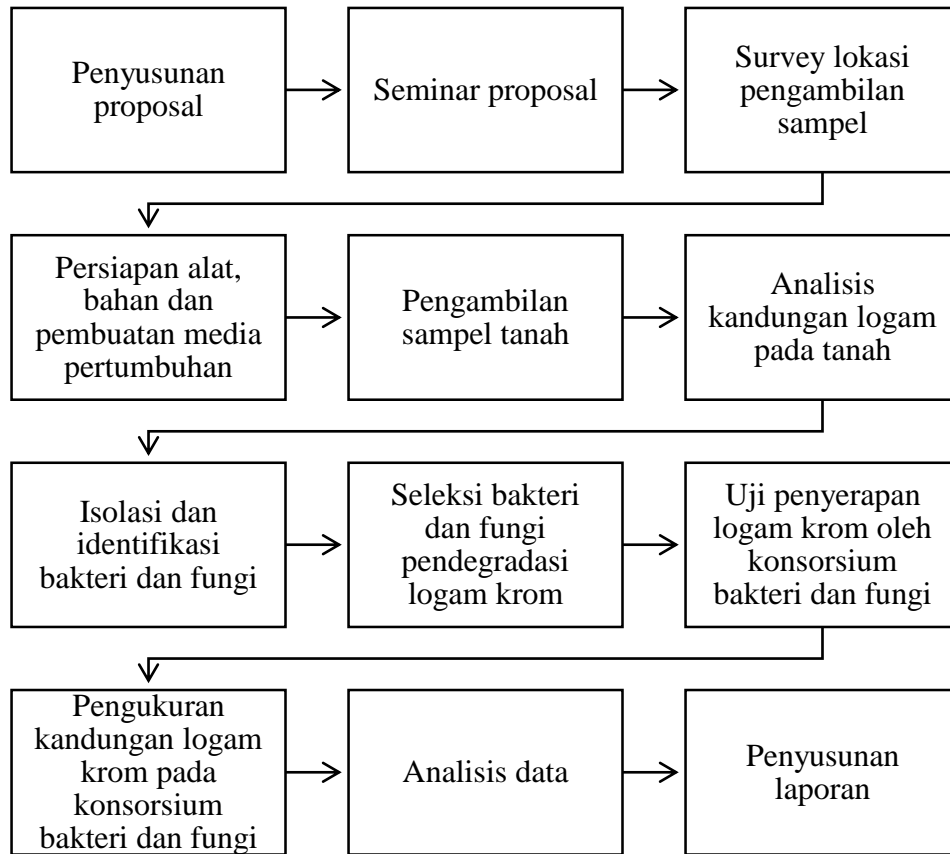
$$\% \text{Bioakumulasi} = \frac{(\text{konsentrasi logam krom awal} - \text{konsentrasi logam krom akhir})}{\text{konsentrasi logam krom awal}} \times 100$$

### 3.5.2.11 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dari hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia untuk mengidentifikasi jenis fungi dan bakteri yang berpotensi sebagai remediator tanah yang tercemar logam krom. Pada hasil uji penyerapan logam krom oleh konsorsium isolat bakteri dan fungi juga dilakukan menggunakan analisis deskriptif.



### 3.6 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Bagan Alur Penelitian