

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan industri yang semakin pesat tidak hanya memberikan dampak positif bagi kehidupan manusia tetapi juga memberikan dampak negatif terhadap lingkungan melalui pencemaran lingkungan (Wijayanti et al. 2022). Pencemaran lingkungan adalah masuknya zat, komponen lain ke dalam lingkungan yang menyebabkan berubahnya tatanan lingkungan akibat kegiatan manusia atau proses alam sehingga mengakibatkan kualitas alam menurun dan tidak berfungsi sesuai peruntukannya (Siregar dan Nasution, 2020). Salah satu permasalahan pencemaran lingkungan yang perlu segera diatasi adalah pencemaran air. Pencemaran air disebabkan oleh aktivitas manusia yang mengakibatkan perubahan kondisi tempat penampungan air seperti sungai (Sompota dan Sinaga, 2022).

Sungai mampu menerima zat-zat pencemar dari lingkungan sekitar yang dapat bersumber dari kegiatan industri, pertanian, dan pemukiman. Aliran sungai yang kerap digunakan masyarakat untuk berbagai aktivitas seperti mandi, cuci hingga irigasi. Namun, tidak menutup kemungkinan sungai juga dimanfaatkan sebagai tempat pembuangan limbah sisa kegiatan domestik dan industri (Surbakti et al., 2024). Limbah domestik dan industri umumnya merupakan pencemar logam berat pada sungai (Ulya, 2022).

Logam berat merupakan zat kimia pencemar yang mempunyai dampak berbahaya terhadap lingkungan jika jumlahnya berlebihan (Aznur et al., 2022). Logam berat merupakan unsur yang memiliki massa jenis lebih dari 5 g/cm³ dan diketahui dapat bersifat toksik bagi organisme hidup apabila berada dalam konsentrasi tinggi. Di alam, terdapat lebih dari 60 jenis logam berat, salah satunya besi (Fe). Besi tergolong logam berat esensial yang dibutuhkan oleh tubuh dalam jumlah terbatas. Namun, jika dikonsumsi secara berlebihan, unsur ini dapat menimbulkan efek racun (Rahmawati dan Zulaika, 2021). Secara geologis, besi berperan sebagai makromineral yang banyak ditemukan di kerak bumi. Sementara itu, dalam sistem biologis tubuh manusia besi berfungsi dalam proses pengangkutan oksigen melalui sel darah merah, serta berperan penting dalam pembentukan enzim dan hemoglobin yang mendukung sistem metabolisme tubuh (Kallang, 2020).

Dampak negatif keberadaan logam besi (Fe) pada perairan menyebabkan air berwarna kekuningan, tumbuhnya bakteri besi, dan kekeruhan secara keseluruhan (Kurniawan et al., 2020). Logam besi (Fe) yang terdapat pada perairan dapat mengganggu ekosistem dan mengganggu ketahanan tanah di sekitar badan



23). Selain itu, dampak negatif lain dari logam berat besi (Fe) dapat menimbulkan gangguan kesehatan karena bersifat akut melalui gangguan fisiologis (Shinta et al., 2024). Kelebihan logam berat dalam tubuh manusia dapat menyebabkan kerusakan pada organ ginjal, hati, pankreas, dan otot jantung (Athirah et al., 2023). Oleh karena itu, kadar logam berat Fe dalam perairan harus dikendalikan (Hadayani et al.,

Logam berat apabila didegradasi dengan metode fisik-kimia seperti koagulasi, presipitasi, adsorpsi, akan membutuhkan biaya relatif mahal dan memerlukan peralatan khusus, serta bahan kimia dengan energi yang besar (Setiawan et al., 2020). Untuk mengatasi permasalahan tersebut digunakan metode biologis yang merupakan metode untuk menghilangkan logam berat yang lebih efektif dan berkelanjutan (Aznur et al., 2022). Bioremediasi merupakan salah satu teknik pemulihan lingkungan yang efektif dalam mengatasi kontaminasi logam berat, dengan memanfaatkan organisme hidup sebagai agen biologis untuk menurunkan konsentrasi logam (Rahmawati dan Zulaika, 2021). Bioremediasi merupakan suatu metode pengelolaan dengan memanfaatkan mikroorganisme seperti bakteri, jamur, khamir, dan enzim yang dihasilkan oleh mikroba tersebut untuk membersihkan atau menetralkan bahan kimia sebagai alternatif dalam penanganan pengendalian lingkungan (Rosa et al., 2022).

Bakteri berpotensi digunakan sebagai agen biologis dalam proses bioremediasi, karena memiliki kemampuan untuk mempertahankan hidupnya di lingkungan tercemar melalui mekanisme bioakumulasi atau biosorpsi. Bakteri yang resisten terhadap logam berat termasuk logam Fe dapat melakukan bioakumulasi logam berat sebagai reseptor elektron dalam mekanisme respirasi sel. Selain itu, bakteri dapat memproduksi polisakarida ekstraselular yang berfungsi sebagai tempat bioadsorpsi atau membentuk metalothionein yaitu suatu protein yang akan mengkelat logam untuk detoksifikasi dan regulasi ion logam di dalam sel (Rahmawati dan Zulaika., 2021). Adapun mekanisme biosorpsi berkaitan dengan adanya ekso polisakarida (EPS) pada dinding sel bakteri yang berperan sebagai pengkelat logam berat pada permukaan sel (Wiro et al., 2022). Berkaitan dengan hal ini maka akan dilakukan penelitian tentang isolasi bakteri yang dapat diaplikasikan untuk mengurangi dampak pencemaran besi (Fe).

1.2 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memperoleh isolat bakteri pengakumulasi logam berat besi (Fe) dari sungai tallo Makassar
2. Memperoleh konsentrasi optimal bakteri pengakumulasi logam besi (Fe) sebagai agen bioremediasi.

1.3 Manfaat

Manfaat penelitian adalah untuk memberikan informasi bakteri yang berpotensi bioremediasi besi (Fe) dan memberikan solusi penanganan pencemaran oleh besi (Fe) dengan cara yang efisien dan murah dengan isolasi bakteri dari sungai tallo Makassar.



1.4 Teori

1.4.1 Sungai Tallo Makassar

Sungai Tallo terletak di wilayah utara Kota Makassar dan memiliki daerah aliran sungai (DAS) seluas kurang lebih 417 km² (Nurhikmah et al., 2022). Sungai Tallo secara geografis mengalir membelah wilayah Kota Makassar dan bermuara langsung ke Selat Makassar. Letak tersebut membuat sungai ini sangat dipengaruhi oleh pasang surut air laut. Selain itu, dasar Sungai Tallo yang berada lebih rendah dari permukaan laut menyebabkan intrusi air asin ke dalam aliran sungai (Fahrudin et al., 2024). Banyaknya aktivitas di sepanjang sungai tallo akan berdampak besar terhadap kualitas air sehingga menyebabkan pencemaran air (Surbakti et al., 2024). Sumber pencemaran air di Sungai Tallo berasal dari limbah pabrik gula Te'ne Makassar, limbah rumah tangga, dan limbah solar dari pembangkit listrik tenaga uap (PLTU) (Fahrudin et al., 2024). Pembuangan limbah ke perairan dapat menyebabkan logam berat terakumulasi dalam sedimen sungai serta dalam tubuh organisme akuatik. Proses akumulasi ini terjadi melalui mekanisme gaya gravitasi, biokonsentrasi, bioakumulasi, dan biomagnifikasi oleh organisme yang hidup di lingkungan perairan (Surbakti et al., 2024). Sedimen di perairan Sungai Tallo mempunyai daya ikat logam yang tinggi karena sedimennya yang berlumpur dan memiliki ukuran partikel halus dengan kadar bahan organik yang tinggi. Pencemaran ini menyebabkan hilangnya keanekaragaman hayati serta peningkatan bioakumulasi zat beracun dalam jaring makanan (Fahrudin et al., 2024).

1.4.2 Pencemaran Logam Berat Besi (Fe)

Pencemaran logam berat merupakan permasalahan lingkungan yang membutuhkan upaya rehabilitasi secara serius dan berkelanjutan hingga saat ini. Logam berat memiliki berat lebih dari 5 g/cm³ pada konsentrasi tinggi, logam berat memiliki efek toksik bagi organisme hidup, termasuk bakteri (Rahmawati dan Zulaika., 2021). Logam berat merupakan salah satu pencemar air yang paling berbahaya, karena bersifat sulit terurai secara alami dan cenderung mengendap di dasar perairan. Selain itu, logam berat juga dapat terakumulasi dalam tubuh organisme melalui rantai makanan (Aznur et al., 2022).

Logam berat yang masuk ke dalam perairan, seperti sungai, akan mengalami perpindahan dari kolom air melalui tiga mekanisme utama, yaitu pengendapan, adsorpsi, dan absorpsi oleh organisme akuatik. Ketika limbah industri dibuang ke perairan, proses pengendapan akan terjadi di lapisan sedimen sehingga konsentrasi pencemar logam berat di sedimen cenderung meningkat. Setelah memasuki lingkungan perairan, logam berat tidak hanya mengendap, tetapi juga



ngcenceran dan penyebaran (dispersi), serta dapat diserap oleh up di ekosistem tersebut. Pengendapan logam berat di suatu ia adanya anion karbonat hidroksil dan klorida (Ekawati et al., dapat berada dalam jumlah yang lebih banyak pada sedimen i badan perairan dikarenakan kemampuannya dalam mengikat ayani et al., 2023).

Besi adalah metal berwarna putih keperakan, liat dan dapat dibentuk (Farisna and Zulaika, 2015). Ferrum (Fe) atau besi adalah unsur dengan nomor atom 26, massa atom 55,847, berat jenis 7,869 g/cm³ dan termasuk golongan VIII B pada sistem periodik. Mempunyai titik lebur 1535 derajat Celcius, titik didih 2750 derajat celcius (Ekawati et al., 2022). Fe banyak diumpai di lingkungan sekitar salah satunya di perairan yang tercemar limbah. Limbah logam Fe di daerah perairan dengan konsentrasi lebih dari 1,0 mg/L dapat menyebabkan air menjadi berwarna kekuningan dan dapat membahayakan manusia karena bersifat racun (Handayani et al., 2022).

Besi dalam air berbentuk ion bervalensi dua (Fe^{2+}) dan bervalensi tiga (Fe^{3+}). Dalam bentuk ikatan dapat berupa Fe_2O_3 , $\text{Fe}(\text{OH})_2$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ atau FeSO_4 tergantung dari unsur lain yang mengikatnya. Kandungan besi dalam air dapat berasal secara alami dari dalam tanah, namun juga dapat berasal dari sumber eksternal lainnya, seperti pelarutan logam besi, pencemaran akibat material berbasis besi, maupun endapan limbah industri. Senyawa besi dalam jumlah kecil di dalam tubuh manusia berfungsi sebagai pembentuk sel-sel darah merah, tetapi zat besi yang melebihi dosis yang diperlukan oleh tubuh dapat menimbulkan masalah kesehatan, dan apabila terakumulasi di dalam tubuh, Fe dapat menyebabkan beberapa gangguan kesehatan (Kurniawan et al., 2020). Kadar logam Fe yang tinggi berdampak pada manusia, seperti keracunan (muntah), kerusakan usus, penuaan dini hingga kematian mendadak, radang sendi, gusi berdarah, kanker, sirosis, sembelit, diabetes, diare, pusing, kelelahan, hepatitis, tekanan darah tinggi, dan insomnia (Soesanto et al., 2023; Shinta et al., 2024).

Kadar kandungan logam besi (Fe) pada air bisa dilihat dari warnanya, apabila warna air kecokelatan maka logam Fe tinggi (Rachmawati et al., 2024). Menurut Firmansyaf (2013) banyaknya kandungan logam berat Fe disebabkan sifat akumulatif dengan jangka waktu yang lama dan terus menerus pada sedimen yang mempunyai sifat relatif menetap dan tidak bergerak. Tingginya konsentrasi logam berat besi (Fe) yang telah melebihi ambang batas baku mutu disebabkan berbagai sumber, baik akibat aktivitas manusia hingga pembuangan limbah industri yang mengandung besi (Surbakti et al., 2024).

1.4.3 Mekanisme Resistensi Bakteri Terhadap Besi (Fe)

Bakteri dikenal sebagai agen bioremediasi karena memiliki sifat degradasi melalui proses enzimatik melalui fungsi degradasi yaitu menurunkan, memecahkan, serta menguraikan rangkaian kompleks menjadi lebih sederhana (Aznur et al., 2022). Biodegradasi logam Fe berlangsung melalui kemampuan bakteri dalam mengakumulasi logam sehingga dapat menurunkan konsentrasinya di lingkungan



n menghilangkannya. Mekanisme pengolahan logam oleh bakteri dengan cara mengeluarkan cairan ekstraseluler akan bereaksi dengan Fe dan kemudian logam Fe yang sudah ada diendapkan pada bakteri membentuk selongsong. Logam Fe dapat mengalami proses degradasi melalui reaksi reduksi yang selanjutnya menghasilkan senyawa yang didukung oleh kemampuan bakteri dalam mensintesis enzim

adaptif yang berperan sebagai katalis dalam mempercepat reaksi biotransformasi tersebut (Nazla, 2022).

Berbagai mekanisme detoksifikasi logam yang efektif telah berhasil dikembangkan oleh bakteri sebagai bentuk adaptasi terhadap lingkungan yang tercemar. Secara umum, mekanisme tersebut dapat diklasifikasikan ke dalam lima kategori, yaitu penyerapan intraseluler, eksklusi logam, reduksi, penyerapan secara ekstraseluler, serta detoksifikasi di luar sel. Seluruh mekanisme resistensi ini dikendalikan oleh gen-gen yang umumnya berada pada plasmid atau transposon. Keberadaan gen tersebut memungkinkan terjadinya transfer gen horizontal atau mutasi spontan, yang pada akhirnya membuat bakteri mampu bertahan terhadap paparan logam berat. Oleh karena itu, bakteri yang memiliki sifat resistensi terhadap logam berpotensi dimanfaatkan dalam upaya remediasi pencemaran logam di lingkungan (Farisna dan Zulaika, 2015).

Resistensi bakteri terhadap logam dapat melalui biosorpsi dan bioakumulasi. Bioakumulasi merupakan proses akumulasi ion-ion logam secara ekstraseluler melewati membrane sel dan siklus metabolisme sel (Lestari et al., 2022). Bakteri yang memiliki sifat resistensi terhadap logam berat, termasuk logam Fe, memiliki kemampuan untuk melakukan proses bioakumulasi (Kurniawan dan Ekowati, 2016). Adapun mekanisme biosorpsi merupakan proses pasif sehingga logam tidak dapat menghambat sel bakteri. Mekanisme biosorpsi berkaitan dengan adanya ekso polisakarida (EPS) pada dinding sel bakteri yang berperan sebagai pengkelat logam berat pada permukaan sel (Wiro et al., 2022).

Extracellular Polymeric Substances (EPS) merupakan senyawa yang diproduksi dan disekresikan oleh bakteri maupun mikroorganisme lainnya, dengan ukuran, komposisi, dan sifat kimia yang beragam. EPS berperan penting dalam meningkatkan kemampuan adaptasi, ketahanan, serta fungsi sel terhadap tekanan lingkungan. EPS sering digunakan secara sinonim dengan kapsul, eksopolimer, sekresi mikroba, maupun slime. Senyawa ini, khususnya ekso polisakarida, dapat dihasilkan oleh bakteri Gram negatif maupun Gram positif. Struktur fisik ekso polisakarida berupa kapsul sampai dengan dinding sel slime masif yang terbentuk di luar membran sel bakteri. Bakteri mampu mengeluarkan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) berupa polisakarida yang disekresikan keluar dinding sel, pada gugus hidoksilnya dapat mengikat Fe. Selain itu, beberapa jenis bakteri mampu menghasilkan protein *metallothionein* sebagai respons adaptif terhadap tingginya paparan logam di lingkungan (Das et al., 2016). Mekanisme yang lain adalah bakteri mempresipitaskan Fe untuk menurunkan konsentrasinya menjadi kompleks yang tidak larut sehingga dapat mengurangi bioavailabilitas dan mekanisme logam Fe di dalam sel bakteri supaya tidak meracuni sel yang disebut siderofor (Rahmawati dan Zulaika., 2021).



BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret - April 2025. Pengujian CNPK dilakukan di Laboratorium Kimia dan Kesuburan Tanah Departemen Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar. Isolasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar. Pengukuran optical density (OD) dilakukan di Laboratorium Terpadu Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar dan Penurunan Kadar Fe dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Kota Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, erlenmeyer, batang pengaduk, gelas kimia, gelas ukur, object glass, ose bulat, bunsen, pipet tetes, botol sampel, kaca preparat, spoit, sendok tanduk, timbangan analitik, mikroskop stereo, autoklaf, *shaker*, oven, inkubator, enkas, *hot plate*, lemari asam, gunting, *smartphone*, GPS, spektrofotometer dan *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS).

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sedimen dari sungai tallo makassar, media *Nutrien Agar* (NA), media *Nutrien Broth* (NB), media *Lactose Broth* (LB), Media *Congo Red Agar* (CRA), $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aquades, alkohol, minyak imersi, safranin, *malachite green*, *crystal violet*, JKJ, kertas label, *tissue*, aluminium foil, kapas, *cling wrap*, masker, lateks dan kasa.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel sedimen sungai tallo dilakukan pada 3 titik. Penentuan lokasi titik penelitian menggunakan metode *purposive sampling*, yaitu suatu metode pengambilan sampel berdasarkan pertimbangan atau kriteria tertentu, bertujuan untuk memperoleh representasi lokasi yang dianggap paling relevan dan sesuai elitian. Sampel sedimen dari sungai tallo yang diambil ent trap. Kemudian dimasukkan ke dalam botol sampel steril menjadi satu sampel komposit. Sampel komposit ini diharapkan karakteristik sedimen secara keseluruhan di wilayah sungai tallo



2.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Peralatan yang terbuat dari kaca disterilisasikan dengan metode panas kering menggunakan oven suhu 180°C selama 2 jam dan jarum ose disterilkan dengan metode panas kering menggunakan nyala api bunsen sampai panas membara. Sedangkan medium pertumbuhan dan aquades disterilkan dengan metode panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.3 Identifikasi Kandungan Unsur Hara Tanah

Analisis Kandungan Carbon (C). Sampel tanah dikeringkan kemudian diayak dan ditimbang sebanyak 0,500 g dengan ukuran $<0,5\text{ mm}$. Dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml kemudian ditambah 5 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ N dan dikocok. Ditambah 7,5 ml H_2SO_4 pekat dan dikocok kemudian diamkan selama 30 menit. Diencerkan dengan air bebas ion kemudian dibiarkan dingin dan diimpitkan. Keesokan harinya diukur absorpsi larutan jernih dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 561 nm.

Analisis Kandungan Nitrogen (N). Analisis dilakukan dengan menggunakan metode *Kjeldahl*. Sampel tanah dikeringkan kemudian digerus dan diayak kemudian ditimbang 0,5 g dengan ukuran $<0,5\text{ mm}$ lalu dimasukkan ke dalam tabung digest. Ditambahkan 1 g campuran selen dan 3 ml asam sulfat pekat kemudian didestruksi hingga suhu 350°C selama 3-4 jam. Destruksi selesai bila keluar uap putih dan didapat ekstrak jernih. Tabung diangkat kemudian ekstrak diencerkan dengan air bebas ion hingga tepat 50 ml dan dikocok sampai homogen lalu dibiarkan semalaman agar partikel mengendap. Ekstrak digunakan untuk mengukur N dengan cara destilasi atau cara kolorimetri.

Analisis Kandungan Posfor (P). Analisis ini dilaksanakan dengan menggunakan metode Olsen. Sampel tanah dikeringkan kemudian digerus dan di ayak setelah sampel tanah $< 2\text{ mm}$ ditimbang sebanyak 1,0 g, dimasukkan ke dalam botol kocok, ditambah 20 ml pengekstrak Olsen, kemudian dikocok selama 30 menit. Disaring dan bila larutan keruh maka dikembalikan lagi ke atas saringan semula. Ekstrak dipipet 2 ml ke dalam tabung reaksi dan selanjutnya bersama deret standar ditambahkan 10 ml pereaksi pewarna fosfat, dikocok hingga homogen dan biarkan 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 889 nm.

Analisis Kandungan Kalium (K). Sampel Tanah dikeringkan kemudian diayak setelah itu ditimbang 2,000 g ukuran $< 2\text{ mm}$ kemudian dimasukkan ke dalam botol lalu dikocok dan ditambahkan 10 ml HCL 25% lalu dikocok menggunakan mesin



dian dimasukkan ke dalam tabung reaksi biarkan semalaman ekstrak jernih contoh dipipet 0,5 ml ke dalam tabung reaksi dan 9,5 ml air bebas ion (pengenceran 20x) dan dikocok. Ekstrak deret standar dipipet sebanyak 2 ml masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 ml pelarut pereaksi pewarna P dan dibiarkan selama 30 menit kemudian diukur absorpsinya

dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 889 nm. Untuk kalium, ekstrak contoh encer dan deret standar K diukur langsung dengan alat SSA secara emisi.

2.3.4 Pembuatan Media Pertumbuhan

Media Nutrien Agar (NA). Pembuatan medium NA dimulai dengan ditimbang sebanyak 4,2 gram kemudian dilarutkan kedalam 150 mL aquades dan dipanaskan di atas hot plate sampai homogen. Selanjutnya, media disterilisasikan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

Media Nutrien Broth (NB). Pembuatan media NB dimulai dengan ditimbang sebanyak 0,8 gram kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml aquades lalu diaduk menggunakan batang pengaduk hingga larut. Selanjutnya, medium disterilisasikan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

Media Congo Red Agar (CRA). Pembuatan media CRA dengan komposisi media sebagai berikut: media LB (2,4 g/L), sukrosa (2,88 g/L), bubuk agar (1,44 g/L) dan pewarna merah congo (0,064 g/L). Media LB, sukrosa dan bubuk agar dilarutkan ke dalam 80 mL aquades dan dididihkan dengan hot plate hingga terlarut sempurna. Pewarna merah Congo ditempatkan pada wadah tersendiri dan diautoklaf secara terpisah dengan larutan media agar. Pewarna merah congo akan dicampurkan dengan media agar setelah selesai diautoklaf dan suhu larutan media agar $\pm 80^{\circ}\text{C}$. Setelah tercampur dengan pewarna merah congo, media agar dituangkan ke dalam cawan petri steril.

2.3.5 Isolasi Bakteri

Penyiapan Pre-Kultur. Bakteri resistensi logam Fe diisolasi dari sampel sedimen diambil sebanyak 1 gram dan dilakukan pengenceran secara berseri menggunakan aquades steril dari 10^{-1} – 10^{-4} .

Isolasi Bakteri Pada Media Nutrient Agar (NA). Sampel dari pengenceran diambil 1 mL kemudian diinokulasikan pada media pertumbuhan *nutrient agar* menggunakan metode *pour plate* lalu diratakan. Selanjutnya, cawan petri direkatkan dengan cling wrap dan dilakukan inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C dengan posisi cawan petri terbalik. Selanjutnya, dilakukan pengamatan dan dihitung jumlah koloni dengan metode SPC (*Standart Plate Count*). Kemudian pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan memilih bentuk koloni yang berbeda dan diinokulasikan dengan teknik gores kuadran menggunakan jarum ose kemudian ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* baru. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Tahap pemurnian dilakukan sebanyak 3 kali.

Isolasi Bakteri Tahan Besi (Fe). Isolat bakteri dari hasil pemurnian sikan pada media pertumbuhan *nutrient agar* dengan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ menggunakan metode gores kuadran. Selanjutnya, n dengan *cling wrap* dan dilakukan inkubasi selama 1 x 24 jam engan posisi cawan petri terbalik. Selanjutnya, dilakukan loni bakteri yang tumbuh merupakan bakteri yang resisten (Fe).



2.3.6 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan mengambil satu jarum ose biakan murni kemudian digoreskan dalam biakan agar dengan permukaan miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

2.3.7 Karakterisasi Bakteri

Pengamatan Makroskopis. Karakterisasi isolat morfologi secara makroskopis dilakukan dengan mengamati ciri pertumbuhan koloni menggunakan mikroskop stereo meliputi pengamatan bentuk, tepian, warna, dan elevansi dari koloni bakteri.

Pengamatan Mikroskopis. Karakterisasi morfologi sel secara mikroskopis dilakukan dengan teknik pengecatan gram bertujuan untuk mengamati bentuk dan sifat gram dari isolat bakteri. Pengecatan gram dimulai dengan membuat ulasan isolat bakteri diatas kaca preparat kemudian ditetaskan dengan aquades dan difiksasi. Selanjutnya, ulasan ditetaskan *crystal violet* sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 60 detik kemudian dibilas menggunakan aquades hingga *crystal violet* meluruh. Kemudian, ditetaskan JKJ sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 60 detik lalu dibilas menggunakan aquades. Setelah itu, ulasan ditetaskan larutan alkohol-aseton sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 30 detik lalu dibilas menggunakan aquades. Selanjutnya, ulasan ditetaskan safranin sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 30 detik lalu dibilas menggunakan aquades hingga safranin meluruh. Diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x dengan menggunakan bantuan minyak imersi.

Produksi Slime oleh Bakteri. Produksi slime secara kualitatif diukur berdasarkan warna koloni bakteri yang tumbuh pada media CRA . Interpretasi hasil menurut ketentuan sebagai berikut: Strain menghasilkan koloni warna hitam pekat, hitam, dan hitam kemerahan dianggap memproduksi slime, sedangkan koloni merah dan kemerahan diklasifikasikan sebagai tidak memproduksi slime.

2.3.8 Uji Resistensi Bakteri Terhadap Besi (Fe)

Penyiapan Kultur. Isolat murni bakteri yang didapatkan pada tahap isolasi, kembali dilakukan inokulasi pada media Nutrient Broth (NB) yang telah diperkaya dengan $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Uji Resistensi Bakteri Terhadap Besi (Fe). Setelah diperoleh isolat bakteri yang mampu pengakumulasi logam berat besi, kemudian bakteri diinokulasikan kedalam media *Nutrien Broth* (NB) yang telah diperkaya dengan $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam konsentrasi resistensi yaitu 0, 5, 15, 30 dan 50 ppm. Kemudian, diinkubasi dalam suhu 3 x 24 jam pada suhu 37°C kecepatan 220 rpm. Setelah dilakukan pengukuran optical density (OD) menggunakan



2.3.9 Uji Akumulasi Penurunan Kadar Besi (Fe) Oleh Bakteri

Pengujian Penurunan Kadar Besi (Fe) Oleh Bakteri. Setelah diperoleh isolat bakteri yang mampu pengakumulasi logam berat besi, kemudian bakteri diinokulasikan kedalam media *Nutrien Broth* (NB) yang telah diperkaya dengan $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam konsentrasi resistensi tertinggi yaitu 50 ppm. Kemudian, diinkubasi dalam *inkubator shaker* selama 3 x 24 jam pada suhu 37°C kecepatan 220 rpm dan diukur kadar besi dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS).

Pengukuran Efisiensi Kadar Fe Oleh Bakteri. Menurut Sappewali (2024) analisis data persentase penurunan kadar besi (%) yaitu :

$$\text{Persentase (\%)} = \frac{P_0 - P_3}{P_0} \times 100\%$$

Keterangan :

P0 = Sebelum Pengelolahan

P3 = Setelah Pengelolahan

2.4 Analisis Data

Analisis data secara kuantitatif dengan mengukur konsentrasi optimal isolat bakteri resisten besi (Fe) menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS) disajikan dalam bentuk histogram. Kemudian, hasil karakterisasi isolat bakteri dan analisis kandungan unsur hara tanah disajikan dalam bentuk tabel.

