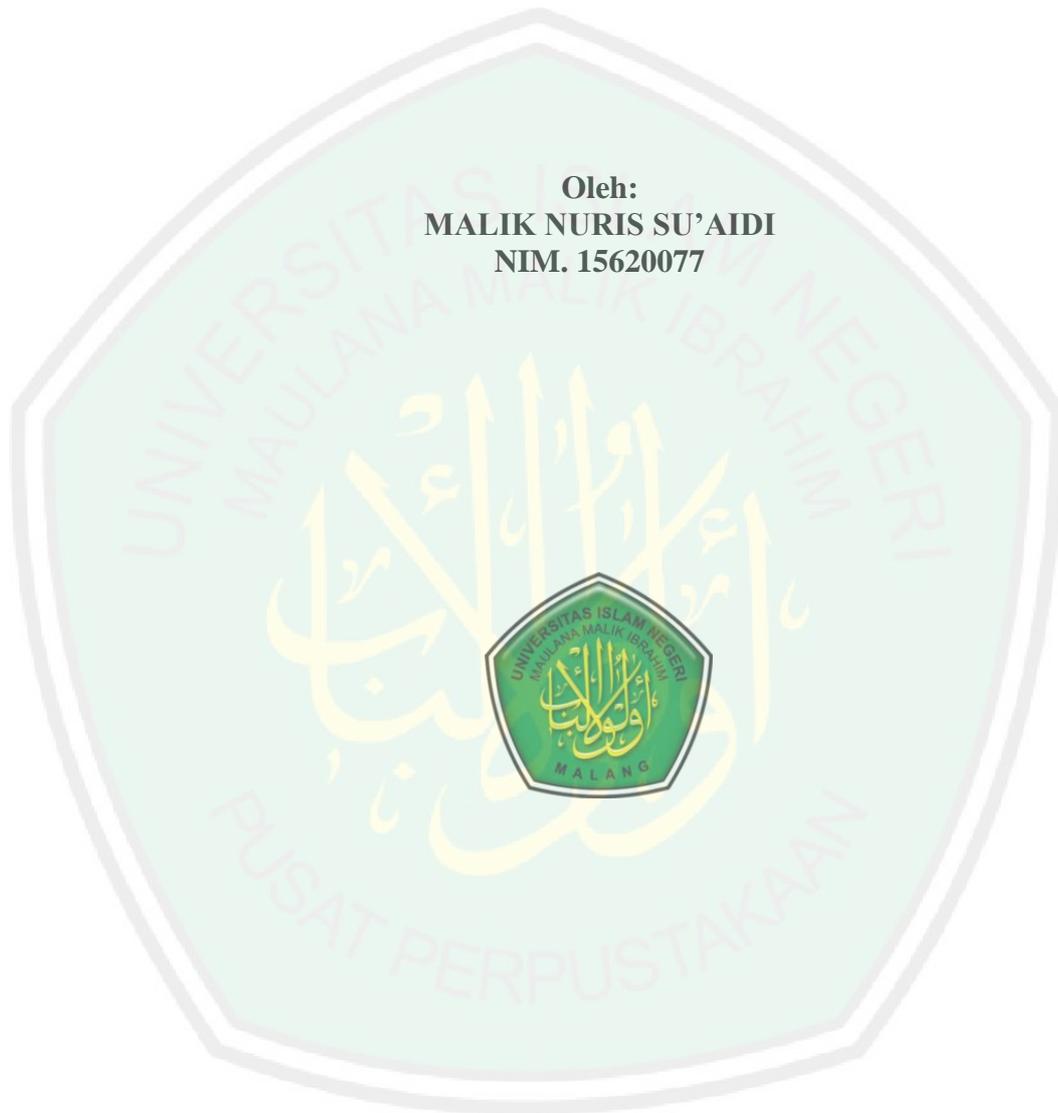


**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI RESISTEN SELENATE ( $\text{SeO}_4^{2-}$ )  
DARI SEDIMEN MANGROVE PANTAI BANYUGLUGUR KABUPATEN  
SITUBONDO, JAWA TIMUR**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MALIK NURIS SU'AIDI**  
NIM. 15620077



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2019**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI RESISTEN SELENATE ( $\text{SeO}_4^{2-}$ )  
DARI SEDIMEN MANGROVE PANTAI BANYUGLUGUR KABUPATEN  
SITUBONDO, JAWA TIMUR**

**SKRIPSI**

Oleh:

**MALIK NURIS SU' AIDI  
NIM. 15620077**

diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2019**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI RESISTEN SELENATE ( $\text{SeO}_4^{2-}$ )  
DARI SEDIMEN MANGROVE PANTAI BANYUGLUGUR KABUPATEN  
SITUBONDO, JAWA TIMUR**

SKRIPSI

Oleh:

**MALIK NURIS SU'AIDI**  
NIM. 15620077

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji:  
Tanggal: 12 Desember 2019

a.n Pembimbing I,

Pembimbing II,

  
**Romaidi, M.Si., D.Sc**  
NIP.19810201 200901 1 019

  
**M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I**  
NIPT.20142011409

Mengetahui  
Ketua Jurusan Biologi



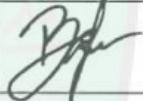
  
**Romaidi, M.Si., D.Sc**  
NIP.19810201 200901 1 019

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI RESISTEN SELENATE ( $\text{SeO}_4^{2-}$ )  
DARI SEDIMEN MANGROVE PANTAI BANYUGLUGUR KABUPATEN  
SITUBONDO, JAWA TIMUR**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MALIK NURIS SU'AIDI**  
NIM. 15620077

telah dipertahankan  
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu  
persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 12 Desember 2019

|                    |  |   |
|--------------------|--|---|
| Penguji Utama      | Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si<br>NIP.19650509 199903 2 002   |   |
| Ketua Penguji      | Bayu Agung Prahardika, M.Si<br>NIP.19900807 201903 1 011 |  |
| Sekretaris Penguji | Romaidi, M.Si., D.Sc<br>NIP.19810201 20091 1019          |  |
| Anggota Penguji    | M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I<br>NIPT.20142011409           |  |

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



**Romaidi, M.Si., D.Sc.**  
NIP.19810201 200901 1 019

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Malik Nuris Su'aidi  
NIM : 15620077  
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi  
Judul Penelitian : Isolasi dan Identifikasi Bakteri Resisten Selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) dari Sedimen Mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo, Jawa Timur

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 26 Desember 2019  
Yang Membuat Pernyataan



  
**Malik Nuris Su'aidi**  
NIM. 15620077

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



## HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan mengucap syukur

(الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ)

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT. Kupersembahkan sebuah karya kecil kepada orang-orang tersayang dan paling berpengaruh di dalam hidup saya terkhusus pada kedua orang tua tercinta. Abah H. Munairi Ikhsan dan Umi Hj. Yus Anna yang tiada hentinya memberikan semangat, doa, nasihat dan materi atas kelancaran penulisan skripsi ini. Doa di setiap sujud sholat Abah Umi yang tak lupa menyebut nama ketiga anakmu, semoga Allah SWT menghadiahkan kesuksesan bagi anakmu serta semoga Allah SWT hadiahkan surga untuk Abah dan Umi kelak. Terimakasih juga untuk Mas (Nurish Shufi) dan Mbak (Nuris Syarifatul Bahraini), yang juga selalu memberi dukungan kepada adik terakhirnya.

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Wr. Wb.*

Puji syukur penulis panjatkan kepada kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahnyalah penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Bakteri Resisten Selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) dari Sedimen Mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo”**. Sholawat serta salam tak lupa terpanjatkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang memberikan bimbingan menuju jalan yang *rahmatal lil alamin*.

Penyusunan skripsi ini tentu tidak mampu terselesaikan jika tidak adanya bimbingan, saran, nasehat, dukungan serta doa dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Abd. Haris, M. Ag. selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Kedua orang tua tercinta Abah H. Munairi Ikhsan dan Umi Hj. Yus Anna yang tiada henti-hentinya selalu mendoakan dan memberi support kepada penulis.
3. Dr. Sri Harini, M. Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Romaidi, M.Si., D.Sc., selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus dosen pembimbing yang sudah bersabar memberikan bimbingan dan pengarahan kepada penulis dalam proses penyusunan skripsi ini.

5. Ibu Dr. Hj Ulfah Utami, M.Si., selaku ketua penguji dan bapak Bayu Agung Prahardika, M.Si. selaku dosen kedua penguji yang telah banyak memberikan pengarahan, kritikan, serta sarannya kepada penulis dalam penelitian skripsi ini.
6. Bapak M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I selaku dosen penguji agama yang telah sabar memberikan saran, nasehat dan kritiknya untuk kelancaran penyusunan skripsi ini.
7. Seluruh dosen, laboran, staf di jurusan biologi yang membantu memberikan kemudahan, terimakasih atas ilmu yang telah diberikan selama kurang lebih 4 tahun ini.
8. Sahabat Genetist (Biologi Angkatan 2015) yang telah banyak memberikan dukungan, terimakasih menjadi keluarga baru di kota Malang.
9. Teman-teman Biologi C 2015, tim Mikrobiologi (Atik, Devi, Septian, Ina, Anita, dkk), Reshma, mas Hari, teman-teman lab fisiologi hewan, terima kasih telah menemani, mensupport, menghibur, dan membantu dalam proses penulisan skripsi. Semoga kesuksesan menjadi hadiah terbaik untuk kalian nanti.
10. Adik-adik angkatan 2016, 2017 dan 2018 terima kasih supportnya, semoga penelitian ini memberikan manfaat untuk kalian.
11. M. Zakaria Alwi, Farah Nahdia Noor, Sakhou Shofi, dan Nuri Thobibatus Shofia Alfaruqi yang selalu mengingatkan dan menemani makan sampai pada proses penulisan skripsi ini.

12. Semua teman-teman dari penulis yang tidak bisa disebutkan satu persatu, semoga semua dukungan kalian dan doa menjadi perantara sukses di dunia dan di akhirat.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bias memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Aamiin Ya Rabbal Alamin.*

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 12 Desember 2019

Penulis

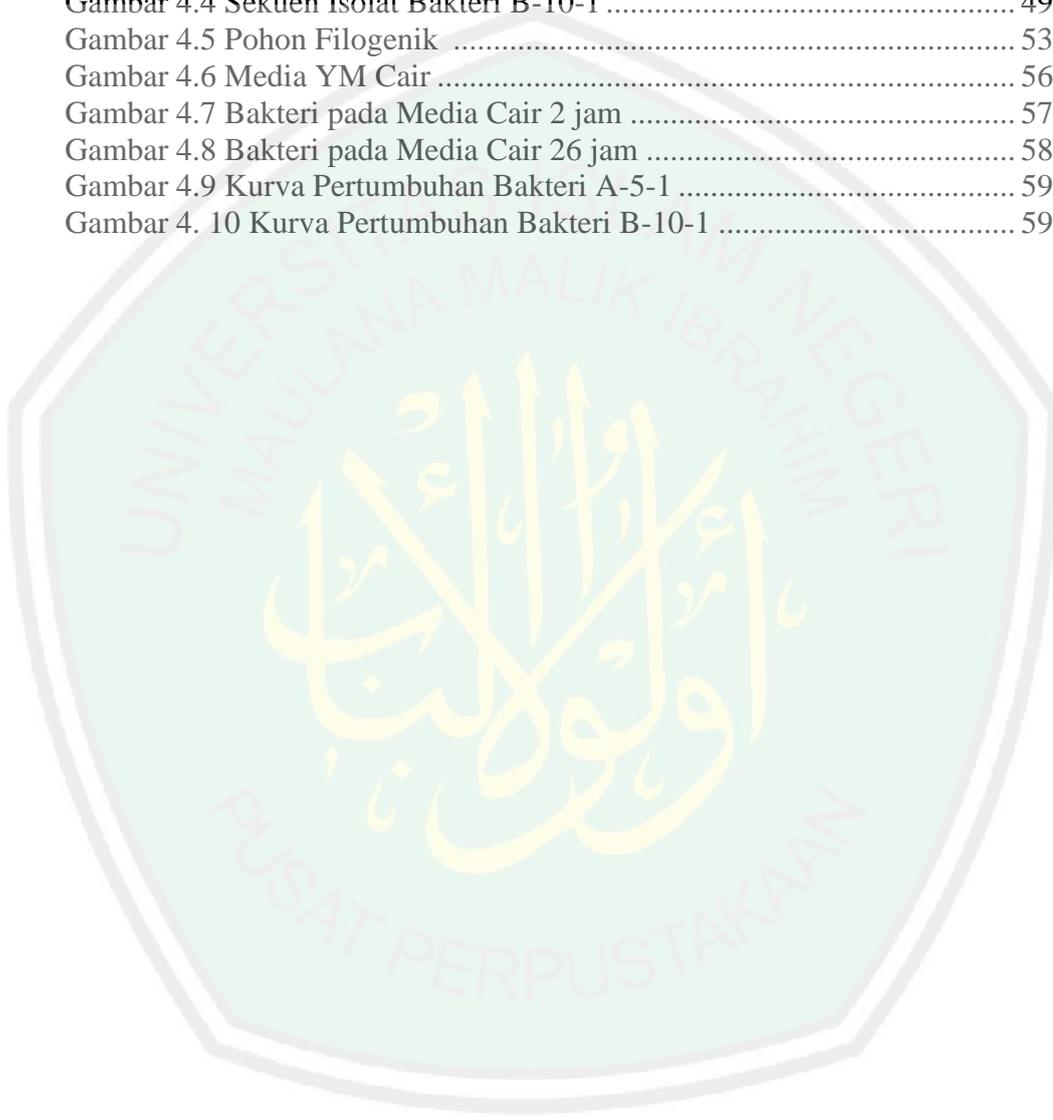
## DAFTAR ISI

|   |              |
|---|--------------|
| <b>HALAMAN JUDUL .....</b>                              | <b>i</b>     |
| <b>HALAMAN PENGAJUAN .....</b>                          | <b>ii</b>    |
| <b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>                        | <b>iii</b>   |
| <b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>                         | <b>iv</b>    |
| <b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>                         | <b>v</b>     |
| <b>PEDOMAN PENGGUNAAN .....</b>                         | <b>vi</b>    |
| <b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>                        | <b>vii</b>   |
| <b>KATA PENGANTAR.....</b>                              | <b>viii</b>  |
| <b>DAFTAR ISI.....</b>                                  | <b>xi</b>    |
| <b>DAFTAR GAMBAR.....</b>                               | <b>xiii</b>  |
| <b>DAFTAR TABEL .....</b>                               | <b>xiv</b>   |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>                            | <b>xv</b>    |
| <b>ABSTRAK .....</b>                                    | <b>xvi</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                   | <b>xvii</b>  |
| <b>البحث ملخص .....</b>                                 | <b>xviii</b> |
| <br>  |              |
| <b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>                          | <b>1</b>     |
| 1.1 Latar Belakang .....                                | 1            |
| 1.2 Rumusan Masalah .....                               | 7            |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....                             | 7            |
| 1.4 Batasan Masalah.....                                | 8            |
| 1.5 Manfaat .....                                       | 8            |
| <br>  |              |
| <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>                     | <b>10</b>    |
| 2.1 Selenium.....                                       | 10           |
| 2.2 Sumber Selenium .....                               | 12           |
| 2.3 Pencemaran dan Toksisitas Se .....                  | 15           |
| 2.4 Mangrove .....                                      | 19           |
| 2.5 Bioremediasi .....                                  | 21           |
| 2.6 Pemanfaatan Bakteri dalam Bioremediasi .....        | 24           |
| 2.7 Mekanisme Resistensi dan Akumulasi Se Bakteri.....  | 26           |
| 2.8 Teknik Identifikasi Molekuler dan Filogenetik ..... | 28           |
| 2.8.1 Isolasi DNA .....                                 | 28           |
| 2.8.2 Amplifikasi DNA .....                             | 29           |
| 2.8.3 Elektroforosis Gel Agarose .....                  | 30           |
| 2.8.4 Squencing DNA .....                               | 30           |
| 2.9 Analisis Filogenik .....                            | 31           |
| <br>  |              |
| <b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>                  | <b>32</b>    |
| 3.1 Rancangan Penelitian .....                          | 32           |
| 3.2 Waktu dan Tempat .....                              | 32           |
| 3.3 Alat dan Bahan Penelitian .....                     | 32           |
| 3.4.1 Alat .....  | 32           |
| 3.4.2 Bahan.....  | 33           |
| 3.4 Prosedur Kerja.....                                 | 33           |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....   | 33        |
| 3.4.2 Pengambilan Sampel .....   | 34        |
| 3.4.3 Pembuatan Media .....  | 34        |
| 3.4.4 Isolasi Bakteri .....  | 35        |
| 3.4.5 Uji Resistensi Bakteri .....   | 36        |
| 3.4.6 Identifikasi Bakteri .....   | 36        |
| 3.4.7 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....  | 39        |
| 3.4.8 Analisis Data .....  | 39        |
| <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>   | <b>40</b> |
| 4.1 Jenis Bakteri Resisten Selenate pada Sedimen Mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo berdasarkan Karakteristik Morfologi dan Molekuler .....                       | 40        |
| 4.1.1 Isolasi Bakteri Resisten Selenate .....  | 40        |
| 4.1.2 Identifikasi Makroskopis .....   | 42        |
| 4.1.3 Pengamatan Gram Bakteri .....  | 43        |
| 4.1.4 Identifikasi Molekuler .....   | 45        |
| 4.1.5 Analisis Filogenetik .....   | 47        |
| 4.2 Karakteristik Pertumbuhan Bakteri Resisten Selenate yang Ditemukan pada Sedimen Mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo dalam Media yang mengandung Selenate ..... | 55        |
| 4.2.1 Uji Kemampuan Resistensi Bakteri .....   | 55        |
| 4.2.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....  | 58        |
| 4.2 Dialog Hasil Penelitian dan Islam .....  | 63        |
| <b>BAB V PENUTUP .....</b>   | <b>69</b> |
| 5.1 Kesimpulan .....   | 69        |
| 5.2 Saran .....  | 69        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>  | <b>70</b> |
| <b>LAMPIRAN .....</b>  | <b>78</b> |

## DAFTAR GAMBAR

|   |    |
|---|----|
| Gambar 2.1 Siklus Selenium.....   | 14 |
| Gambar 2.2 Transformasi Selenium dinding sel <i>Thauera selenatis</i> ..... | 27 |
| Gambar 4.1 Pewarnaan Gram .....   | 44 |
| Gambar 4.2 Gel Elektroforesis.....  | 46 |
| Gambar 4.3 Sekuen Isolat Bakteri A-5-1 .....                                | 48 |
| Gambar 4.4 Sekuen Isolat Bakteri B-10-1 .....                               | 49 |
| Gambar 4.5 Pohon Filogenik .....  | 53 |
| Gambar 4.6 Media YM Cair .....  | 56 |
| Gambar 4.7 Bakteri pada Media Cair 2 jam .....                              | 57 |
| Gambar 4.8 Bakteri pada Media Cair 26 jam .....                             | 58 |
| Gambar 4.9 Kurva Pertumbuhan Bakteri A-5-1 .....                            | 59 |
| Gambar 4. 10 Kurva Pertumbuhan Bakteri B-10-1 .....                         | 59 |



## DAFTAR TABEL

|   |    |
|---|----|
| Tabel 2.1 Konsentrasi Selenium .....              | 15 |
| Tabel 4.1 Hasil Isolat Bakter.....                | 41 |
| Tabel 4.2 Karakteristik Isolat Bakteri .....      | 43 |
| Tabel 4.3 Karakteristik Cat Gram Bakter .....     | 44 |
| Tabel 4.4 Hasil <i>Blast</i> Isolat Bakteri ..... | 47 |
| Tabel 4.5 Jarak Genetik Isolat Bakteri .....      | 51 |



## DAFTAR LAMPIRAN

|  |    |
|--|----|
| Lampiran 1 Pembuatan Sediaan Larutan $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ..... | 75 |
| Lampiran 2 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....                           | 77 |
| Lampiran 3 Urutan Basa Nukleotida.....                               | 78 |
| Lampiran 4 Hasil <i>Sequencing</i> Isolat .....                      | 79 |
| Lampiran 5 Lokasi Pengambilan Sampel .....                           | 81 |



# Isolasi dan Identifikasi Bakteri Resisten Selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) dari Sedimen Mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo, Jawa Timur

Malik Nuris Su'aidi, Romaidi, M. Mukhlis Fahrudin

## ABSTRAK

Pencemaran menjadi masalah serius yang harus dihadapi oleh masyarakat global. Selain pencemaran di darat, pencemaran di perairan juga perlu menjadi perhatian serius. Hal ini dikarenakan perairan yang memiliki Kawasan yang sangat luas dan berbagai residu kegiatan memungkinkan akan terbuang di dalam perairan. Diantara pencemaran terhadap lingkungan perairan adalah adanya penambangan dan pembuangan limbah terhadap laut. Selenium merupakan unsur logam yang menjadi salah satu sumber cemaran akibat adanya penambangan. Selenium dapat bersifat toksik menjadi Selenate (VI), dan dapat terakumulasi sehingga berpeluang mengancam kesehatan manusia. Oleh karena itu, digunakan bakteri sebagai agen bioremediasi terhadap kontaminasi selenate. Media yang digunakan adalah *yeast media ekstrak agar* (YMEA) dengan penambahan natrium selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) konsentrasi 0 mM; 1 mM, 2 mM, 5 mM; dan 10 mM. Metode dalam penelitian ini meliputi isolasi bakteri, uji resistensi isolat, isolasi DNA bakteri, dan sekuensing. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan dalam resistensi selenate dianalisis secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNA dan pengamatan karakteristik pertumbuhan. Hasil penelitian didapatkan 2 bakteri yang dapat resisten selenate dengan menunjukkan warna merah pada media. Hasil *sequencing* yang di analisis dengan pohon filogenik diperoleh isolat A-5-1 memiliki jarak kedekatan genetik 57% dengan isolat B-10-1 dan jarak kekerabatan antar keduanya sebesar 0,201.

Kata kunci: Isolasi, Bakteri Resisten, Selenate, Sedimen Mangrove

## **Isolation and Identification of Selenate Resistant Bacteria ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) from Mangrove Sediment of Banyuglugur Beach, Situbondo Regency, East Java**

Malik Nuris Su'aidi, Romaidi, M. Mukhlis Fahrudin

### **ABSTRACT**

Pollution is a serious problem that must be faced by the global community. In addition to land pollution, water pollution also needs to be a serious concern. This is because the waters that have a very wide area and a variety of residual activities may be wasted in the waters. Among the pollution of the aquatic environment is the existence of mining and disposal of waste to the sea. Selenium is a metal element that is one source of pollution due to mining. Selenium can be toxic to Selenate (VI) and can accumulate so that it has the potential to threaten human health. Therefore, bacteria are used as bioremediation agents against selenate contamination. The media used were yeast agar extract (YMEA) with the addition of sodium selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) concentration of 0 mM; 1 mM, 2 mM, 5 mM; and 10 mM. The methods in this study include bacterial isolation, isolate resistance testing, bacterial DNA isolation, and sequencing. Bacterial isolates which have the ability in selenate resistance were analyzed molecularly based on 16S rRNA genes and observed growth characteristics. The results found 2 bacteria that can be resistant to selenate by showing red in the media. The results of sequencing analyzed with phylogenic trees obtained isolate A-5-1 had genetic proximity of 57% with isolate B-10-1 and the distance between them was 0.201.

Keywords: Isolation, Resistant Bacteria, Selenate, Mangrove Sediment

## العزلة وتحديد البكتيريا لمقاوم السيلينات ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) من رواسب المانغروف لشاطئ بانيلوغور سيتوبوندو، جاوة الشرقية

مالك نور السعيد، رميدي، مخلص فخر الدين

### ملخص البحث

التلوث هو مشكلة جدا التي تجب أن تواجهها مجتمع العالمي. بالإضافة إلى تلوث الأرض، يحتاج تلوث المياه أيضًا لأن يكون اهتمام جاد. وذلك لأن المياه التي لديها مساحة واسعة جدا ومجموعة متنوعة من الأنشطة المتبقية قد تضع في المياه. واحد من انواع تلوث البيئة المائية هو وجود التعدين والتخلص من النفايات في البحر. السيلينيوم عنصر معدني الذي يعد أحد مصادر التلوث بسبب التعدين. يمكن أن يكون السيلينيوم سامًا إلى السيلينات (VI)، ويمكن أن يتراكم حتى يتسنى ان يهدد صحة الإنسان. لذلك، استخدم البكتيريا كعوامل المعالجة الحيوية على تلوث سيلينات. الوسائط هي استخراج أجار (YMEA) مع إضافة نتريوم سيلينات ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) لتركيز 0 مم؛ 1 مم، 2 مم، 5 مم؛ و 10 مم. الطرق هذا البحث العزلة البكتيرية، اختبار العزلة المقاومة، العزلة الحمض النووي البكتيريا، والتسلسل. حللت العزلة البكتيرية التي لها القدرة على مقاومة سيلينيت جزيئيًا بناء على جينات rRNA 16S وملاحظة الخصائص النمو. وجدت النتائج 2 بكتيريا يمكن أن يتقاوما السيلينات من خلال إظهار اللون الأحمر في الوسط. كانت نتائج التسلسل التي حللتها باستخدام الأشجار التطورية حصلت عليها العزلة A-5-1 لها مسافة القرب الوراثية بنسبة 57% مع العزلة B-10-1 ومسافة القرب بينها هي 0.201.

الكلمات الرئيسية: العزلة، البكتيريا المقاوم، سيلينات، رواسب المانغروف

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Pencemaran lingkungan terus menjadi perhatian dunia dan menjadi salah satu tantangan besar yang dihadapi oleh masyarakat global. Pencemaran dapat berupa senyawa alami yang bila bersentuhan dengan lingkungan menyebabkan perubahan yang merugikan. Ada berbagai jenis pencemaran, yaitu anorganik, organik, dan biologis (Masindi, 2018). Terlepas dari jenis pencemaran tersebut, hal itu mendapat perhatian yang cukup besar dikarenakan dampak yang mereka berikan pada lingkungan. Di antara semua cemaran terhadap lingkungan, logam berat mendapat perhatian penting oleh ahli kimia lingkungan karena sifatnya yang beracun. Logam berat biasanya ada dalam jumlah kecil di perairan alami tetapi banyak dari mereka beracun bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah. Logam seperti arsenik, timah, kadmium, nikel, merkuri, kromium, kobalt, seng, dan selenium sangat beracun bahkan dalam jumlah kecil (Salomons, *et al.*, 1995). Logam berat menjadi beracun ketika tidak dimetabolisme oleh tubuh dan menumpuk di jaringan tubuh (Herawati, *et al.*, 2000; He, *et al.*, 2005).

Logam berat dapat berasal dari proses alami dan antropogenik dan berakhir di kompartemen lingkungan yang berbeda (tanah, air, udara). Banyak penelitian telah melaporkan berbagai sumber alami logam berat, tersebut termasuk letusan gunung berapi, semprotan garam laut, kebakaran hutan, pelapukan batuan, sumber biogenik dan partikel tanah yang terbawa angin. Proses pelapukan alami dapat menyebabkan pelepasan logam dari bola endemiknya ke kompartemen lingkungan yang berbeda. Logam berat dapat ditemukan dalam bentuk hidroksida,

oksida, sulfida, sulfat, fosfat, silikat dan senyawa organik. Logam berat yang paling umum adalah timbal (Pb), nikel (Ni), kromium (Cr), kadmium (Cd), arsenik (As), merkuri (Hg), seng (Zn) dan tembaga (Cu) (Herawati, *et al.*, 2000).

Selenium (Se) merupakan suatu unsur yang memiliki sifat semi logam dan memiliki bentuk yang beragam yang terdapat secara alami dan tersebar luas di alam, seperti pada batu dan tanah (Yunita, 2018). Selenium ditemukan dalam dua bentuk, yaitu berupa bentuk anorganik dan bentuk organik. Bentuk anorganik selenium adalah selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) dan selenite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), dan selenium dalam bentuk organik adalah selenometionin dan selenosistein (Sunde, 2006). Menurut Nancharaiyah dan Lens, (2015) Selenate (VI) merupakan bentuk selenium yang memiliki bilangan oksidasi lebih tinggi dari selenite (IV). Jorge *et al.*, (2008) menambahkan bahwa bilangan oksidasi yang lebih tinggi pada selenium menyebabkan tingkat toksisitas yang tinggi pula sehingga saat di lingkungan dapat lebih membahayakan daripada Selenite (IV).

Kondisi dengan toksisitas lebih tinggi daripada selenium menyebabkan selenate (VI) menjadi salah satu sumber pencemaran terhadap lingkungan. Sumber pencemaran selenium di alam disebabkan oleh beberapa hal. Risher *et al.*, (2001) menjelaskan Se dalam lingkungan dapat bersumber dari proses geologis alam seperti erupsi vulkanik yang menyebabkan pelepasan selenium ke udara dan dapat terakumulasi dalam tanah dan juga pada permukaan air. Menurut Goldhaber (2003), Mishra *et al.*, (2011), dan Combs (1998) Selenium sebagian besar berasal dari kegiatan di bidang elektronik. Se juga dapat ditemukan pada industri kaca, plastik, cat, tinta, dan karet serta dalam pembuatan obat-obatan (pakan gizi aditif unggas dan ternak). Ike *et al.*, (2000) dan Javed, *et al.*, (2016) menjelaskan, Se

juga digunakan dalam produksi pigmen, pestisida, dan *stainless steel* serta ditemukan dalam hasil buangan produksi penyamakan kulit dan tidak terkecuali pada pembangkit listrik menjadi penyumbang adanya logam selenium pada lingkungan perairan. Hal itu dapat meningkatkan jumlah selenium yang apabila terakumulasi akan menyebabkan dampak negatif terhadap lingkungan dan biota laut.

Kaitannya dengan pencemaran pada lingkungan, sebenarnya kerusakan atau pencemaran yang terjadi disebabkan karena ulah perbuatan manusia. Mereka lebih mementingkan urusan pribadi dari pada kemaslahatan umat atau kepeuliannya terhadap lingkungan. Dalam Al-Quran surah Ar-Rum ayat 41 Allah berfirman:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ

*Artinya: "Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)"*

Kedudukan manusia sebagai khalifah dimuka bumi ini memiliki beban amanah yang sangat penting demi mencegah kerusakan-kerusakan di bumi. Kata (الْفَسَادُ) *al-fasad* menurut *al-Ashfahani* adalah keluarnya sesuatu dari keseimbangan, baik sedikit maupun banyak. Kata yang digunakan menunjukkan apa saja, baik jasmani, rohani, maupun hal-hal lain. Ayat tersebut juga sebenarnya menjelaskan secara tersirat bahwa kerusakan yang terjadi adalah ketidakseimbangan serta berkurangnya nilai kemanfaatan yang diperoleh dari darat ataupun dari perairan. Laut telah tercemar, daratan semakin terasa panas akibat dari kemarau yang berkepanjangan merupakan salah satu contoh dari

kerusakan akibat ulah manusia. Alam raya telah Allah SWT ciptakan dalam suatu sistem yang sangat serasi dan sesuai dengan kehidupan manusia. Tetapi mereka melakukan kegiatan buruk yang mengganggu hingga merusak sehingga kepincangan alam terjadi dalam sistem kerja alam (Shihab, 2002).

Suatu unsur dapat berbahaya bagi tubuh manusia apabila kadarnya melebihi ambang batas normal yang dapat diterima. Menurut Notodarmojo (2005), Se juga dapat bersifat toksik dalam tubuh manusia apabila terakumulasi atau dikonsumsi secara berlebihan. Beberapa permasalahan yang dapat muncul akibat berlebihan mengkonsumsi Se, misalnya gangguan pada sistem pernafasan karena menghirup Se, serta gangguan pada kulit, dan juga dapat menimbulkan gejala kardiovaskular. Lemly (2004), menjelaskan bahwa Se dalam kadar yang tinggi dapat bersifat toksik dan sangat beracun pada tubuh hewan dan tumbuhan ketika Se dalam bentuk oksianion terlarut. Pengaruh kronis paparan selenium juga akan berdampak pada selenosis, neurotoksisitas, dan juga dapat menyebabkan gangguan pada fungsi endokrin diproses sintesis hormone tiroin (Vincenti, *et al.*, 2014).

Timbulnya logam berat selenium dalam lingkungan kehidupan manusia merupakan salah satu contoh dari sikap manusia yang memanfaatkan sumber daya alam di bumi dengan tidak memikirkan hal-hal yang kemudian akan terjadi dalam jangka waktu panjang. Menurut Kozdroj dan van Elsas (2001), kegiatan manusia telah mencemari lingkungan dengan logam berat beracun dan metaloid selama 200 tahun terakhir dan, akibatnya, telah mengakibatkan gangguan parah keseimbangan ekologis di sebagian besar ekosistem, termasuk pada lingkungan pantai. Salah satu pantai yang dimungkinkan akan terdampak oleh pencemaran

logam berat selenium pada tingkat +6 (selenate) adalah Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo. Kondisi pantai yang berbatasan langsung dengan unit III Pembangkit Listrik Tenaga Uap (PLTU) Paiton menjadi indikator kemungkinan adanya potensi pencemaran partikel-partikel tersuspensi selenate pada perairan tersebut. Selain hal tersebut, adanya aktifitas kapal tongkang pengangkut batu bara hasil tambang di sekitar pantai juga dimungkinkan akan menjadi salah sumber pencemaran limbah selenate pada perairan maupun pada sedimen pantai.

Padatnya aktifitas pertambangan tengah laut dan kegiatan perkapalan pengangkut batu bara serta aktifitas geologis alam juga memungkinkan akan berdampak pada kawasan mangrove yang berada disekitar pantai tersebut. Kawasan mangrove merupakan perbatasan antara perairan dengan daratan yang memungkinkan segala bentuk residu atau sisa hasil kegiatan perindustrian serta pertambangan yang terbawa oleh arus laut akan tertinggal di sekitar mangrove, baik pada tanaman maupun pada sedimen mangrove. Residu tersebut dapat berbagai macam bentuknya, tidak terkecuali limbah logam-logam berat selenium yang berasal dari aktivitas masyarakat sekitar pantai yang terbawa arus ombak serta adanya limbah buangan pabrik diberbagai daerah yang juga bertanggung jawab atas hadirnya cemaran selenium diperairan tersebut.

Kehadiran partikel-partikel tersuspensi logam berat pada perairan pantai menyebabkan adanya cemaran yang bersifat toksik, baik pada lingkungan maupun pada biota. Upaya dalam mengurangi efek dari cemaran Se adalah dengan dilakukannya remediasi untuk mengurangi pengaruh buruk terhadap organisme. Menurut Liu *et al.*, (2015) beberapa metode remediasi antara lain secara fisik, kimia dan biologi (bioremediasi). Dari ketiga metode tersebut, bioremediasi

merupakan metode yang paling aman dan tidak menimbulkan efek negatif untuk digunakan dalam meremediasi kondisi lingkungan yang tercemar. Selain itu dalam segi biaya, metode ini lebih hemat karena memanfaatkan makhluk hidup sebagai agen. Bioremediasi umumnya digunakan sebagai metode untuk mengurangi toksisitas terhadap logam berat, termasuk selenium. Bioremediasi selenium dapat dilakukan dengan menggunakan perantara berbagai jenis organisme makro (tumbuhan), dan juga organisme mikro, seperti jamur dan bakteri (Srinivas, 2008).

Penelitian mengenai bakteri sebagai agen remediasi selenium tidak banyak dikaji. Penelitian mengenai bakteri yang dapat resisten serta dapat menurunkan tingkat toksisitas selenium telah banyak ditemukan di tanah dan di perairan tawar. Beberapa contoh bakteri yang ditemukan antara lain *Ralstonia metallidurans* CH-34 pada sedimen pabrik seng di Belgia (Roux *et al.*, 2001), *Shewanella oneidensis* ditemukan pada sedimen sungai (Klonowska dan Vermeglio, 2005), *Pseudomonas stutzeri* dan *P. fluorescens* yang ditemukan di perairan sungai Jepang (Ike *et al.*, 2000), *P. putida* KT2440 yang diisolasi dari air drainase yang terkontaminasi selenium di San Joaquin Valley, California (Avendano, 2016), *Desulfovibrio desulfuricans* (Tomei *et al.*, 1995). Sementara bakteri yang diisolasi dari perairan laut tidak banyak ditemukan, terlebih yang memiliki kemampuan dalam mereduksi dan mengakumulasi dari tingkat selenium bervalensi tinggi atau selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ). Sementara beberapa bakteri di lingkungan mangrove masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini difokuskan dalam usaha menemukan bakteri yang dapat resisten dan diduga dapat mengakumulasi selenium pada tingkat toksisitas tinggi ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) dari sedimen mangrove Pantai

Banyuglugur Kabupaten Situbondo yang didapat dari pengamatan makroskopis hingga pada tahap molekuler.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian ini memiliki rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apa saja jenis bakteri yang memiliki kemampuan resisten selenate pada sedimen mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo berdasarkan karakteristik morfologi dan molekuler?
2. Bagaimana karakteristik pertumbuhan bakteri resisten selenate yang ditemukan pada sedimen mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo dalam media selenate?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui jenis bakteri yang memiliki kemampuan resisten selenate pada sedimen mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo berdasarkan karakteristik morfologi dan molekuler.
2. Mengetahui karakteristik pertumbuhan bakteri resisten selenate yang ditemukan pada sedimen mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo dalam media selenate.

#### 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dari prenelitian ini adalah:

1. Lokasi pengambilan sampel dilakukan di kawasan sedimen mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo.
2. Sampel diambil dari permukaan sedimen disekitar lokasi mangrove.
3. Penentuan stasiun pengambilan sampel sedimen diperoleh dari 3 titik.
4. Konsentrasi sodium selenate yang digunakan pada pengujian ini adalah 0 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, dan 10 mM.
5. Media tumbuh bakteri menggunakan media padat YMEA (*Yeast Malt Extract Agar*), YMEB (*Yeast Malt Extract Broth*) yang mengandung sodium selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ).
6. Teknik yang digunakan dalam mengisolasi bakteri dengan cara pengenceran bertingkat yang diinokulasikan pada media padat YMEA dengan cara *streak plate*.
7. Teknik dalam menganalisis bakteri dengan cara identifikasi makroskopis, cat gram, dan identifikasi molekuler 16s rRNA serta identifikasi filogenik.

#### 1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi tentang jenis bakteri sedimen mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo yang dapat resisten terhadap logam selenate.
2. Memberikan informasi mengenai peranan bakteri resisten dan akumulator dalam mengatasi cemaran selenium pada ekosistem laut.

3. Memberikan inspirasi agar dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap bakteri resisten dan akumulator dari perairan laut, terlebih pada sedimen mangrove.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Selenium

Selenium merupakan unsur kimiawi yang memiliki nomor atom 34 dan memiliki massa atom 78.96 g/mol. Se terletak di grup 16, antara unsur sulfur dan telurium serta antara arsenik dan bromin pada Periode 4. Devi *et al.*, (2017) menjelaskan unsur dari selenium disebut juga golongan kalkogen. Selain karena berada di golongan ke VIA, selenium mampu membentuk sulfide ( $H_2S$ ). Hidrogen sulfida memiliki sifat gas yang tidak berwarna, sangat beracun, dan bersifat *odiferous*.

Selenium memiliki empat keadaan oksidasi alami (4 bilangan valensi), yaitu valensi -2, 0, +4, dan +6 (Butter *et al.*, 2012). Dalam oksidasi (0) terdiri dari selenium elemental ( $Se^0$ ); oksidasi (-2) terdiri dari natrium selenide ( $Na_2Se$ ) dan hidrogen selenide ( $H_2Se$ ); bilangan oksidasi (+4) terdiri dari natrium selenite ( $Na_2SeO_3$ ), selenium dioksida ( $SeO_2$ ) dan asam selenious ( $H_2SeO_3$ ); bilangan oksidasi (+6) terdiri dari natrium selenate ( $Na_2SeO_4$ ), dan asam selenate ( $H_2SeO_4$ ) (Dummont, 2006). Menurut Stadtman (1990) dan Stolz *et al.*, (2006) menjelaskan bahwa unsur selenium merupakan unsur metaloid yang merupakan sifat diantara logam dan non-logam.

Secara umum selenium dibagi menjadi 2 bentuk, yaitu dalam bentuk organik dan dalam bentuk anorganik. Bentuk organik dari selenium berikatan dengan protein sebagai asam amino yang dapat ditemukan pada tubuh dalam bentuk selenosistein dan selenometionin (Dilaga, 1992; Budiyanto, 2014). Sedangkan menurut Johanson *et al.*, (2005) menjelaskan pada bentuk anorganik,

selenium terdiri dari selenida ( $\text{Se}^{2-}$ ) dan selenite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ). Unsur organik selenium umumnya ditemukan dalam bentuk selenoprotein berupa L-selenomethionine yaitu metionin yang gugus sulfurnya digantikan oleh selenium. Menurut Nuttal (2006), beberapa bentuk selenium organik yang terdapat di alam diantaranya selenosistein, selenosistin, diselenosistin, selenometionin, dan selenodiglutation. Menurut Vincenti, *et al.*, (2014) selenium dalam bentuk selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) dan selenite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) menjadi unsur yang paling berbahaya dan sangat beracun bagi manusia dikarenakan bilangan oksidasinya.

Se dapat sangat mudah diserap dalam pencernaan. Se masuk ke dalam tubuh melalui makanan yang mengandung selenium, contohnya kacang, daging dan telur. Menurut Sunde *et al.*, (2012), makanan laut dan daging organ adalah sumber makanan terkaya selenium. Sedangkan sumber makanan lain dari selenium juga termasuk daging berserat, sereal dan biji-bijian, serta dapat ditemukan pula pada produk susu. Risher *et al.*, (2001), tubuh manusia dengan mudah menyerap senyawa selenium organik (misalnya, asam selenoamino).

Selenium juga dapat masuk dalam tubuh melalui air minum dalam bentuk natrium selenate dan natrium anorganik. Namun, jumlah selenium dalam air minum tidak signifikan secara nutrisi. Berdasarkan analisis data tahun 2009-2010 yang dilakukan oleh *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), rata-rata asupan selenium harian di Amerika yang berusia 2 tahun ke atas adalah 108,5 mcg yang diperoleh dari makanan dan dari 120,8 mcg berasal dari suplemen (*U.S. Department of Agriculture*). Pria dewasa memiliki asupan harian yang lebih tinggi (134 mcg dari makanan dan 151 mcg dari suplemen) daripada wanita dewasa (93 mcg dari makanan dan 108 mcg dari dan suplemen).

Sekitar 18% hingga 19% orang dewasa dan anak-anak di Amerika menggunakan suplemen makanan yang mengandung selenium (Bailey *et al.*, 2011).

## 2.2 Sumber Selenium

Selenium merupakan bagian dari unsur kalkogen (VIA) yang keberadaannya tidak melimpah di kerak bumi seperti unsur-unsur kalkogen lainnya, misal sulfur dan Tellurium (Staicu, 2017). Secara alami sebagai elemen, selenium tidak dapat dibuat atau dihancurkan, meskipun selenium dapat mengubah bentuk di lingkungan. Kemunculan selenium dibagi menjadi 2 yaitu muncul secara alami dan muncul secara antropogenik. Secara alami selenium muncul akibat kegiatan vulkanik, pelapukan batuan dan sedimen tanah, serta aktivitas biogeokimia. Sementara secara antropogenik, kegiatan dibidang industri menjadi penyumbang terbesar akan kemunculan selenium di lingkungan, termasuk perairan. Beberapa kegiatan industry yang menjadi sumber adanya selenium di lingkungan antara lain pada proses pembuatan karet, kaca, pembuatan komponen listrik, serta pemakaian bahan bakar. Selenium juga muncul akibat kegiatan di bidang pertanian, seperti penggunaan pestisida, pupuk tanah, dan campuran fosfat (Eswayah, 2018; Triana, 2010; Haygart, 1994; Gebreyessus, 2019). Menurut Budiyanto (2014), sumber utama yang menjadi munculnya selenium di alam adalah berasal dari batuan yang kaya akan karbon serta bahan-bahan organik. Selain batu-bara, bensin juga memiliki kandungan selenium dalam jumlah yang tinggi (Luoma dan Rainbow, 2008).

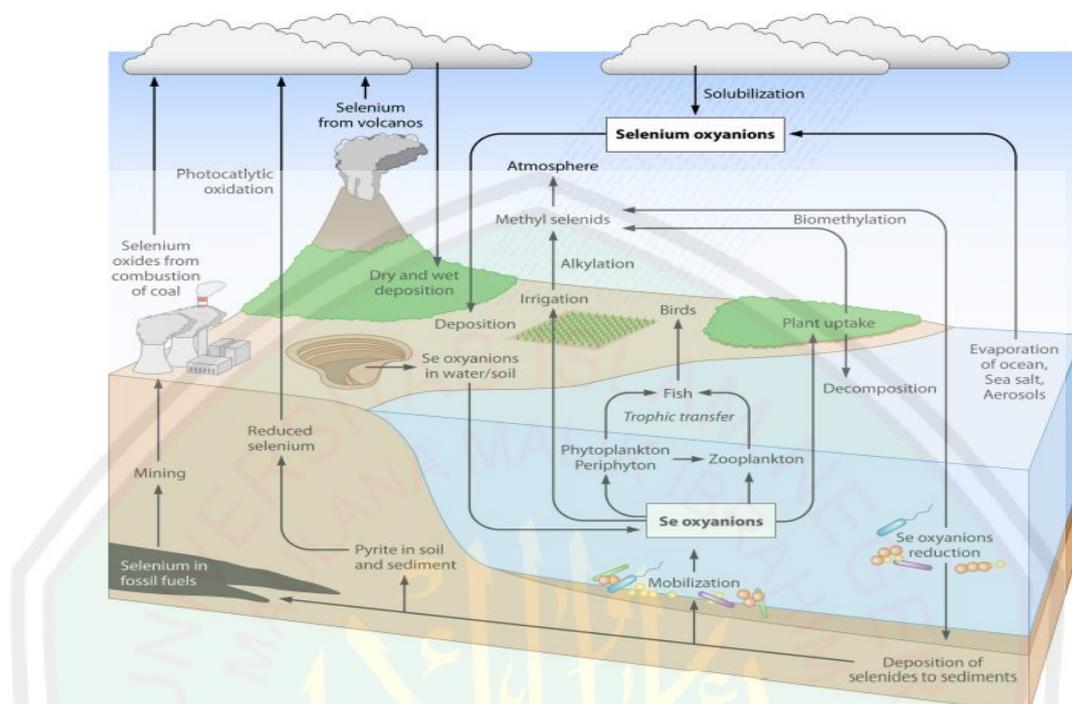
Reservoir selenium terbesar di Bumi adalah bijih sulfida, pirit, dan batubara berkadar sulfur tinggi. Sumber geologis dan antropogenik melepaskan selenium

sebagai  $\text{SeO}_4^{2-}$  ke lingkungan (Gambar 2.1). Selenium, suatu unsur penting, berasimilasi dari selenate atau selenite oleh mikroba dan tanaman di dasar jaring makanan dan selanjutnya oleh hewan. Selenium kemudian berasimilasi menjadi organoselenides (misalnya Selenoprotein) dalam organisme hidup. Penguraian organisme mati melepaskan selenium kembali ke lingkungan. Aktifitas penambangan, pembakaran bahan bakar fosil, pertanian, letusan gunung berapi, dan aktifitas bahan bakar nuklir melepaskan selenium ke atmosfer, tanah, dan air dalam bentuk yang dapat larut (misalnya  $\text{SeO}_4^{2-}$  dan  $\text{SeO}_3^{2-}$ ). Mikroorganisme memainkan peran penting dalam siklus senyawa selenium di alam (Nancharaiyah dan Lensa, 2015).

Partikel selenium yang terbawa udara, seperti abu, dapat mengendap di tanah atau air permukaan. Pembuangan selenium dalam produk komersial dan limbah juga dapat meningkatkan jumlah selenium dalam tanah. Bentuk selenium dalam tanah sangat tergantung pada keasaman lingkungan dan interaksinya dengan oksigen. Daerah dengan lokasi didekn gunung vulkanik menjadi sangat tinggi konsentrasi selenium, dimulai dari 50-90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dan bahkan bias lebih tinggi (Gebreyassus, 2019).

Keberadaan selenium di lingkungan sangat dipengaruhi oleh tingkat oksidasi dan perbedaan akibat perilaku senyawa-senyawa kimianya yang berbeda (EPA, 1979; NAS, 1976). Keadaan oksidasi selenium di lingkungan bergantung juga pada kondisi disekitar, terutama pada pH, pE, dan aktivitas biologis (Maier *et al.*, 1988). Selenium selain terdapat pada lingkungan hasil dari kegiatan antropogenik dan residu dari kegiatan perindustrian, unsur selenium juga dapat

ditemukan pada sumber makanan secara alami, seperti pada buah-buahan, kacang-kacangan dan susu (Tabel 2.1).



Gambar 2.1 Siklus selenium secara global di alam. (Nancharaiah, 2015).

Selenium bersifat fotovoltatik, yaitu kemampuan dalam mengubah cahaya menjadi listrik. Pencemaran selenium pada permukaan air berasal dari beberapa sumber, termasuk dari perairan berdempingan yang mungkin mengandung selenium, dan dari drainase bawah permukaan air. Pabrik pengolahan limbah adalah sumber lain pelepasan selenium ke air. Limbah dari pabrik pengolahan limbah dan kilang minyak menjadi sumber utama selenium dalam sistem muara San Francisco (Cutter 1989). Selenium ditemukan dilepaskan selama penambangan batubara karena oksidasi pirit bantalan selenium (Dreher dan Finkelman 1992). Data WHO (1971), mencatat bahwa tanpa adanya peran dari faktor antropogenik, konsentrasi selenium di alam sangat rendah dan bahkan tidak lebih dari kisaran ng- $\mu\text{g/L}$ . penyebaran kontaminasi selenium. Menurut Luoma

dan Rainbow (2008), kontaminasi seleneium bersifat local dan tidak dapat didistribusikan seperti pada jenis logam merkuri (Hg).

Tabel 2.1 Konsentrasi Selenium pada beberapa Sumber Makanan di Amerika Serikat (mg selenium/kg, wet weight) (Schubert *et al.*, 1987; Secor dan Lisk, 1989).

| Jenis Makanan                            | Rata-rata | Batas Minimum | Batas Maximum |
|--|-----------|---------------|---------------|
| Buah-buahan dan sayur-sayuran            |           |               |               |
| Apel, mentah                             | 0.004     | 0.003         | 0.006         |
| Wortel, mentah                           | 0.017     | 0.006         | 0.029         |
| Jeruk                                    | 0.015     | 0.013         | 0.018         |
| Kentang                                  | 0.013     | 0.004         | 0.023         |
| Biji-bijian, kacang-kacangan, dan sereal |           |               |               |
| Roti, putih                              | 0.32      | 0.23          | 0.54          |
| Roti, gandum utuh                        | 0.44      | 0.28          | 0.67          |
| Sereal jagung                            | 0.063     | 0.026         | 0.12          |
| Mie telur, kering                        | 0.66      | 0.43          | 1.35          |
| Mie telur, dimasak                       | 0.19      | 0.14          | 0.42          |
| Kacang, Brazil                           | 14.7      | 0.20          | 253           |
| Produk susu                              | 0.016     | 0.011         | 0.025         |
| Susu                                     | 0.083     | 0.062         | 0.10          |
| keju Swiss                               | 0.060     | 0.052         | 0.068         |
| Daging                                   | 0.21      | 0.17          | 0.26          |
| Ayam, dimasak                            | 0.26      | 0.15          | 0.52          |
| Daging sapi, dimasak                     | 0.33      | 0.19          | 0.51          |
| Seafood                                  | 0.75      | 0.31          | 1.49          |
| Salmon, kalengan                         | 0.64      | 0.21          | 1.61          |
| Udang, kalengan / dimasak                | 2.84      | 2.54          | 3.44          |

### 2.3 Pencemaran dan Toksisitas Se

Kontaminasi akan logam berat menjadi permasalahan yang sangat penting untuk diatasi. Meskipun ada regulasi atau kebijakan yang mengatur serta mengikat dari pemerintah dengan dikeluarkannya PP No. 82 tahun 2001 dan Permen LH No. 13 Tahun 2010, nampaknya masih ditemukan lemahnya praktek serta pengawasan di lapangan sehingga menyebabkan kualitas air dan ekosistem air menjadi turun. Dalam PP No. 82 tahun 2001 telah diatur tentang pengelolaan

kualitas air dan pengendalian pencemaran air, dimana ambang batas dari selenium adalah 0,01 mg/L untuk kelas 1 dan 0.05 mg/L untuk kelas 2,3 dan 4 (Priadie, 2012).

Terkait selenium, Nuttal (2006) menjelaskan bahwa masalah yang terpenting adalah selenium ditentukan sebagai konsentrasi totalnya, terlepas dari kenyataan bahwa berbagai bentuk kimia selenium memiliki potensi toksik yang berbeda terhadap lingkungan dan yang hidup di dalamnya. Dalam beberapa laporan tercatat, konsentrasi serum selenium mencakup rentang berikut: 400-30.000 µg/L terkait dengan toksisitas akut, 500–1400 µg/L yang terkait dengan toksisitas kronis, dan <1400 µg/L bebas dari toksisitas; kategori ditentukan oleh tanda dan gejala pada pasien. Sebagian besar laporan yang menggambarkan keracunan selenium akut melibatkan konsumsi senyawa anorganik seperti asam selenious, yang ditemukan dalam agen yang membiru pistol, dan kematian yang terjadi pada hari pertama dikaitkan dengan kadar selenium darah postmortem > 1400 µg/L. Kadar selenium jaringan menunjukkan pola yang kompleks dan peningkatan signifikan pada organ seperti ginjal tidak selalu mengindikasikan toksisitas.

Dumont (2006), menyatakan unsur dari selenium merupakan salah satu dari 18 *trace element* yang penting dalam tubuh, terlebih dalam proses metabolisme. Mertz (1981), menjelaskan bahwa setiap *trace element* pada suatu unsur dapat bersifat toksik ketika dalam jumlah yang tinggi dan pada konsentrasinya melebihi ambang batas. Beberapa parameter menentukan nilai optimum dari suatu mineral, tidak terkecuali selenium.

Sebuah studi pembuangan langsung dari kilang minyak di San Francisco ditemukan rata-rata konsentrasi selenium dalam limbah adalah 0,067 mg/L dengan kisaran 0,0066-0,156 mg/L (Barceloux 1999; Cutter 1989). Sekitar 50-76% dari total dalam limbah selenium adalah selenite (Cutter 1989). Sekitar 150.000 – 460.000-ton selenium per tahun disimpan dalam bentuk abu batu bara (Andren dan Klein 1975; Doran 1982). Lemly (1985) mencatat bahwa konsentrasi 0,10-0,25 mg/L ditemukan dalam endapan cekungan limbah dari abu batubara di North Carolina. Luapan dari bak abu dari fasilitas pembangkit listrik berbahan bakar batubara ke Danau Belews juga menghasilkan selenium pada permukaan air dengan konsentrasi 0,005-0,020 mg/L di sekitar wilayah cekungan danau. Puncak konsentrasi Selenium terjadi pada tahun 1996, sekitar <0,001 mg / L (Lemly 1997). Tercatat konsentrasi selenium setinggi 0,28 mg / L untuk limbah mentah, 0,045 mg / L untuk limbah primer, dan 0,050 mg / L untuk limbah sekunder (Baird *et al.*, 1972).

Selain pada air, pencemaran serta toksisitas selenium juga ditemukan pada tanah. Faktor utama yang mengontrol konsentrasi selenium dalam tanah adalah kandungan selenium dari bahan batuan induk yang melepaskan selenium melalui proses pelapukan dan pencucian (NAS 1976). Proses pelapukan alami diperkirakan melepaskan sekitar 100.000–200.000 metrik ton selenium per tahun (Andren dan Klein 1975). Deposisi selenium di atmosfer juga berkontribusi terhadap selenium di tanah. Di masa lalu, selenium digunakan dalam produk pestisida, tetapi karena kestabilannya dalam tanah dan kontaminasi berikutnya pada tanaman pangan, penggunaannya dalam produk pestisida sekarang dibatasi.

Pelepasan selenium ke tanah dari kolam pengendapan abu layang dan situs limbah berbahaya belum banyak dicatat.

Gupta (2017) menyatakan bahwa aktifitas geologis alam menjadi faktor utama kasus keracunan unsur selenium pada perairan. Menurut Grutzmacher, (2013), dampak dari pencemaran selenium pada lingkungan berdampak pada organisme yang hidup disekitarnya. Keracunan selenium umumnya terjadi ketika ion pada selenium tertentu di dalam tanah maupun permukaan air terserap oleh organisme makhluk hidup dan terakumulasi dalam tubuh makhluk hidup. Islam telah memberikan penjelasan sedemikian rinci dan tegas melalui dua sumber pokoknya (al-Quran dan hadits Nabi) mengenai fenomena atau musibah yang menimpa manusia di bumi.

Kaitannya dengan musibah yang terjadi diatas muka bumi ini, Allah SWT. Telah berfirman dalam surah Ibrahim ayat 7:

وَإِذْ تَأْتِيَنَّكُمْ رِزْقٌ لِّغَيْرِ رَبِّكُمْ لَمَّا كَفَرْتُمْ إِنَّا نَعْلَمُ مَا كُنْتُمْ تَعْمَلُونَ

*Artinya: "Dan (ingatlah juga), tatkala Tuhanmu memaklumkan: "Sesungguhnya jika kamu bersyukur, pasti Kami akan menambah (ni`mat) kepadamu, dan jika kamu mengingkari (nikmat-Ku), maka sesungguhnya azab-Ku sangat pedih".*

Musibah atau bencana adalah hukuman serta laknat dari Allah kepada orang-orang yang kufur atas nikmat Allah SWT berupa alam yang sering kali dirusak tanpa melihat kemanfaatannya bagi kehidupan. Menurut Malik Madani (1997), keingkaran atau sifat kufur manusia terhadap nikmat yang Allah lah yang menjadikan turunnya azab di bumi yang sangat memberatkan. Tujuan dari itu semua adalah agar manusia menyadari perbuatannya sehingga akhirnya dia akan kembali kepada Allah, yakni jalan yang benar, jalan yang selalu bersyukur atas

kenikmatan yang diterimanya dari Allah SWT selama ini. Tegasnya dijelaskan bahwa kerusakan yang dimaksud dalam ayat tersebut adalah kerusakan yang diakibatkan oleh perbuatan tangan-tangan manusia, juga berupa tindakan maksiat dan kerusakan-kerusakan moral lainnya.

#### 2.4 Mangrove

Mangrove atau disebut sebagai hutan bakau merupakan biotop pantai yang meliputi seperempat garis pantai tropis dunia akan tetapi terancam punah. Mangrove memiliki berbagai manfaat ekologis, seperti menjadi sumber utama bahan organik terestrial ke lautan, dan menjadi titik pusat keanekaragaman hayati. Menurut Simões *et al.*, (2015) mikroba adalah komponen utama keanekaragaman hayati yang terdapat pada ekosistem mangrove, dengan 91% merupakan bakteri dan jamur dari total biomassa yang hidup di sekitar mangrove.

Mangrove merupakan habitat pantai yang unik dan ekologis yang menonjol di daerah tropis dan subtropis dan sering dipandang sebagai vegetasi pelopor di wilayah pesisir. Wilayah spesifik tempat tanaman bakau tumbuh disebut sebagai “hutan bakau” menempati beberapa juta hektar wilayah pantai di seluruh dunia dan didistribusikan lebih dari 112 negara dan wilayah (Alongi, 2002). Bakau juga bertahan hidup di beberapa zona beriklim tetapi ada penurunan cepat dalam jumlah spesies dengan meningkatnya garis lintang (Bandaranayake, 1998). Sejumlah faktor biologi, fisik, dan kimia statis dan dinamis diketahui mempengaruhi perkembangan dan stabilitas komunitas bakau. Faktor-faktor ini dan interaksinya memainkan peran penting dalam aliran nutrisi dalam sistem dan

menjadi perlu untuk memahami berbagai proses yang berinteraksi (Ravilkumar *et al.*, 2002).

Penelitian tentang biografi, botani, zoologi, pencemaran lingkungan dan dampak ekonomi dari hutan bakau telah banyak dilakukan. Tetapi masih sedikit diketahui tentang aktivitas mikroba di perairan dan sedimen bakau. Studi tentang keanekaragaman mikroba di perairan mangrove dan sedimen diperlukan untuk mengklarifikasi proses siklus biokimia dan penghilangan polutan. Semua bentuk mikroba termasuk bakteri, jamur, cyanobacteria serta makro dan mikroganggang tercatat ditemukan dalam ekosistem ini (Dias *et al.*, 2010). Studi komprehensif yang dilakukan Sen dan Naskar (2003) melaporkan bahwa kelompok bakteri bakau yang umum antara lain terdiri dari: pereduksi sulfat (*Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* spp.), pembentuk N<sub>2</sub> (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Rhizobium* spp.), pelarut fosfat (*Bacillus*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, *Xanthobacter* spp.), anoksigenik fotosintetik (*Beggiatoa*, *Chloronema*, *Chromatium*, *Leucothiobacteria*, *Thiopedia* spp.) dan metanogenik (bakteri Methanocoides).

Sumber lain juga menjelaskan bahwa berbagai kelompok jamur seperti ligninolitik, selulolitik, pektinolitik, jamur amilolitik dan proteolitik serta aktinomiset terdapat dalam ekosistem mangrove. Perlu diketahui bahwa, mikroorganisme mengambil peran penting dalam proses produksi enzimatik. Hal itu dikarenakan kemampuan produksinya yang tinggi, biaya rendah dan kerentanan terhadap manipulasi genetik. (Quecine *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012). Tidak banyak informasi tersedia tentang potensi bioteknologi mikrobiota

mangrove. Menurut Thatoi *et al.*, (2012), bahwa tanah rhizosfer bakau menampung populasi mikroorganisme bermanfaat dari aplikasi pertanian skala besar. Mereka memiliki kemampuan untuk memperbaiki nitrogen, melarutkan fosfat, menghasilkan amonia serta menghasilkan asam asetat indol.

Kathiresan dan Selvan (2006), membuktikan bahwa bakteri yang diisolasi dari lingkungan salin bakau adalah kandidat yang baik untuk meningkatkan kesuburan tanah gersang dan tanah salin reklamasi. Tantangan nyata untuk mendapatkan manfaat dari spesies halofilik yang berlaku di ekosistem saline bakau, selain kepentingan bioteknologi mereka, adalah seberapa jauh anggota yang toleran garam ini dapat digunakan sebagai inokulum untuk tanaman lapangan yang dibudidayakan di tanah yang terkena garam.

## **2.5 Bioremediasi**

Pemanfaatan bioremediasi dalam mengatasi cemaran logam berat dan menurunkan kadar polutan bukan suatu hal yang baru. Bioremediasi akan mengatasi permasalahan di lingkungan akibat kegiatan pertambangan atau perindustrian (Priadie, 2012). Bioremediasi adalah degradasi tanah dan air tanah yang terkendali secara biologis yaitu oleh mikroba tanah untuk menghasilkan produk akhir yang stabil dan tidak berbahaya, seperti CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O (Srinivas, 2008). Bioremediasi merupakan teknik yang tepat sebagai salah satu cara untuk menetralkan kondisi lingkungan, dengan memanfaatkan agen-agen biologis sebagai mediatornya (Waluyo, 2009).

Pemerintahan Indonesia telah memiliki regulasi dalam menjalankan bioremediasi guna mengatasi dan mengurangi cemaran akibat kegiatan

pertambangan dan perminyakan dan juga akibat dari penggunaan pestisida. Pemerintah melalui Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No.128 tahun 2003, yang mengatur tentang tatacara serta persyaratan teknis dan pengelolaan limbah minyak bumi dan tanah terkontaminasi oleh minyak bumi secara biologis atau disebut juga Bioremediasi (Priadie, 2012).

Kondisi tanah dan air akan membentuk suatu dasar yang penting bagi bakteri (makhluk mikroskopis) untuk berkembang. Namun, mikroba perlu nutrisi cukup yang dimungkinkan kurang dalam limbah serta dalam tanah karena tanah memiliki tingkat kesuburan yang bervariasi (mungkin sangat subur atau benar-benar mandul). Dari semua proses pengolahan limbah, pengolahan biologis lebih murah daripada proses fisik dan kimia asalkan limbah tersebut dapat terbiodegradasi, lebih mudah larut dalam air, dan tidak beracun bagi mikroba (Srinivas, 2008).

Limbah buangan dari kolam stabilisasi limbah dan kebocoran bensin dari tangki penyimpanan bahan bakar bawah tanah berkontribusi terhadap pencemaran tanah dan air tanah. Selain itu, meledaknya wadah bahan kimia, tumpahan racun yang tidak disengaja, pembuangan pertanian yang kaya akan pestisida, minyak, dan pelarut pembersih dari garasi juga bertanggung jawab atas kontaminasi tanah dan air. Setiap industri berkontribusi limbah industri yang menambah polusi tanah dan air tanah. Cat dan limbah pernis (dari tempat pembuangan akhir saniter) berkontribusi terhadap gangguan sistem saraf dan keracunan logam berat selain bersifat karsinogen, tidak terlepas dari adanya logam berat selenium di dalamnya.

Bioremediasi digunakan sebagai upaya manusia untuk merawat segala pemberian dari Allah SWT. Dalam Surah Al-Baqarah ayat 30 Allah SWT berfirman:

وَإِذْ قَالَ رَبُّكَ لِلْمَلَائِكَةِ إِنِّي جَاعِلٌ فِي الْأَرْضِ خَلِيفَةً ۗ قَالُوا أَتَجْعَلُ فِيهَا مَنْ يُفْسِدُ فِيهَا وَيَسْفِكُ الدِّمَاءَ وَنَحْنُ نُسَبِّحُ بِحَمْدِكَ وَنُقَدِّسُ لَكَ ۗ قَالَ إِنِّي أَعْلَمُ مَا لَا تَعْلَمُونَ

*Artinya: Ingatlah ketika Tuhanmu berfirman kepada para malaikat, "Sesungguhnya Aku hendak menjadikan seorang khalifah di muka bumi." Mereka berkata, "Mengapa Engkau hendak menjadikan (khalifah) di bumi itu orang yang akan membuat kerusakan padanya dan menumpahkan darah, padahal kami senantiasa bertasbih dengan memuji Engkau dan menyucikan Engkau!" Tuhan berfirman, "Sesungguhnya Aku mengetahui apa yang tidak kalian ketahui."*

Allah SWT memberikan penghormatan kepada makhluk ciptaanNya, yaitu manusia di depan para malaikat sebelum mereka diciptakan. Kata *khilafah* ( خليفة ) pada asalnya memiliki arti pengganti atau yang menggantikan. Ada beberapa yang menafsirkan pada kata ini bahwa khalifah memiliki arti bahwa Allah bermaksud dengan pengangkatan itu sebagai ujian bagi manusia dan memberi kepada manusia suatu penghormatan. Ayat ini menunjukkan bahwa kekhalifahan terdiri dari kewenangan dari Allah SWT, makhluk yang disertai tugas, yakni Adam as. dan anak cucunya, serta wilayah tempat bertugas, yakni bumi yang terhampar ini (Shihab, 2002).

Kaitannya dengan alam, manusia yang diberi amanat oleh Allah SWT untuk menjaga alam serta merawat bumi seisinya agar dalam kehidupan terjadi keseimbangan, antara faktor abiotik dan faktor biotik. Merawat alam dengan cara memanfaatkan segala yang telah ada untuk menjadikan alam yang lebih baik merupakan usaha dalam menjalankan tugas sebagai makhluk ciptaan yang paling sempurna.

Bioremediasi adalah konversi polutan potensial dari tanah dan air organik atau alam anorganik menjadi zat yang tidak berbahaya oleh mikroorganism. Karena bergantung pada jenis bakteri sebagai agen yang bertanggung jawab atas degradasi, bioremediasi diklasifikasikan sebagai aerobik atau anaerob karena adanya oksigen atau oksigen bebas dalam keadaan gabungan saat prosesnya. Sebagian besar biodegradasi bersifat aerobik karena proses anaerob relatif lambat dan sulit dipertahankan untuk proses bioremediasi. Tetapi lebih disukai bila reduksi lebih disukai daripada oksidasi seperti pada senyawa yang diklorinasi. Bioremediasi yaitu dekomposisi limbah oleh bakteri tanah yang berhasil digunakan untuk degradasi lumpur minyak bumi sekarang digunakan untuk biodegradasi Benzena, Alkohol, Klorofenol, pestisida dan hidrokarbon lain yang pernah dianggap tahan terhadap biodegradasi.

## 2.6 Pemanfaatan Bakteri dalam Bioremediasi

Kaitannya dengan adanya peranan bakteri dalam proses dalam bioremediasi, Allah telah menjelaskan dalam surah Yunus ayat 101:

قُلْ أَنْظُرُوا مَاذَا فِي السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ ۖ وَمَا تُغْنِي الْآيَاتُ وَالنُّذُرُ عَنْ قَوْمٍ لَا يُؤْمِنُونَ

*Artinya: Katakanlah, "Perhatikanlah apa yang ada di langit dan di bumi!" Tidaklah bermanfaat tanda-tanda (kebesaran Allah) dan rasul-rasul yang memberi peringatan bagi orang yang tidak beriman."*

Shihab (2002) menjelaskan bahwa dalam ayat ini menerangkan kepada manusia untuk mencermati serta merenungi segala sesuatu yang terdapat dimuka bumi dan segala seisinya yang merupakan bukti-bukti dari keagungan dan keEsaan Tuhan. Seberapa besarnya ancaman yang telah Allah tunjukkan sebagai

bukti kekuasaannya tidak akan membuat para kaum ingkar mau berfikir atas segala sesuatu. Dalam ayat ini juga mendorong manusia untuk terus mengembangkan ilmu pengetahuan melalui kontemplasi, eksperimentasi dan pengamatan. Selain itu juga terdapat makna untuk menggali pengetahuan yang berhubungan dengan alam raya beserta isinya.

Bioremediasi umumnya melibatkan makhluk hidup mikroskopis atau disebut mikroorganisme, baik jamur ataupun bakteri sebagai alat menurunkan tingkat polutan atau tingkat cemaran pada kadar tertentu. Tujuan dari penggunaan agen-agen hayati adalah agar struktur polutan yang bersifat toksik dapat terurai dengan melibatkan enzim-enzim yang dihasilkan (disintesis) oleh mikroorganisme yang berkaitan (Priade, 2012). Pemanfaatan bakteri sebagai alat perbaikan menjadi solusi untuk menanggulangi pencemaran lingkungan terlebih dari adanya cemaran logam berat. Menurut Neuhir *et al.*, (2005), penggunaan mikroorganisme mampu memulihkan kondisi lingkungan tercemar dari logam berat, seperti timbal (Pb), tembaga (Cu), dan merkuri (Hg). Sedangkan pada logam selenium masih lebih banyak diperantarai oleh tanaman hiperakumulator.

Perbedaan dari bioremediasi pada lingkungan tercemar oleh tanaman dan oleh bakteri terletak pada mekanisme detoksifikasinya, Menurut Staicu (2017), detoksifikasi oleh tanaman pada logam berat menggunakan mekanisme asimilatoris, sedangkan oleh bakteri menggunakan mekanisme dissimilatoris. Perbedaan nya terletak pada tempat terjadinya proses tersebut. Pada proses disimilasi terjadi perombakan antara  $\text{SeO}_4^{2-}$  atau senyawa selenate menjadi  $\text{SeO}_3^{2-}$  atau selenite. Pada proses tersebut terjadi pertukaran ion yang terjadi di dinding sel. Sedangkan pada proses asimilasi terjadi di dalam sel dengan melibatkan

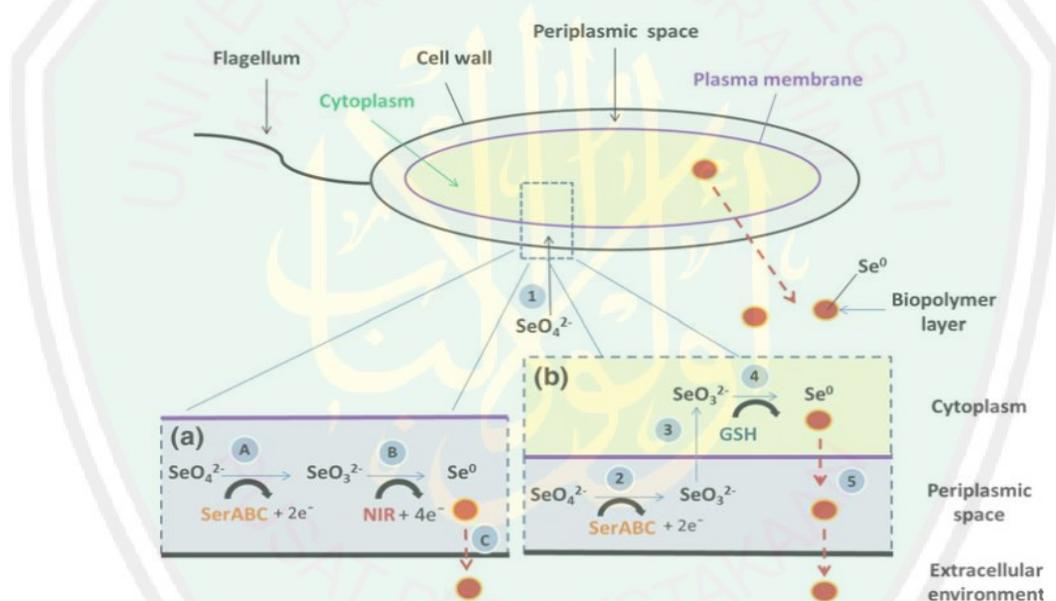
enzim-enzim sehingga menghasilkan produk protein atau selenoprotein serta menghasilkan gas.

Tingkat toleransi terhadap logam berat pada makhluk hidup tergantung pada kandungan logam berat alami pada makhluk hidup itu tersendiri, bahkan kepekatannya 2-3 kali lipat dari normal. Menurut Yajid (2007), bakteri yang dapat bertahan hidup terhadap logam berat memiliki respon serta mekanisme pada tubuhnya, antara lain dengan proses bioakumulasi, biopretisipasi, methylasi, dan bioreduksi.

## **2.7 Mekanisme Resistensi dan Akumulasi Se Bakteri**

Bakteri bertahan hidup dalam kondisi tekanan logam mengembangkan beberapa jenis mekanisme untuk mentolerir penyerapan ion logam berat. Mekanisme ini termasuk penghilangan ion logam di luar sel, akumulasi dan kompleksasi ion logam di dalam sel, dan reduksi ion logam berat ke keadaan yang kurang beracun (gambar 2.2). Dalam konsentrasi tinggi, ion logam berat bereaksi membentuk senyawa toksik dalam sel (Nies, 1999). Spain (2003) menjelaskan, untuk memiliki efek toksik, ion logam berat harus terlebih dahulu masuk ke dalam sel. Karena beberapa logam berat diperlukan untuk fungsi enzimatik dan pertumbuhan bakteri, ada mekanisme penyerapan yang memungkinkan masuknya ion logam ke dalam sel. Menurut Staicu dan Barton (2017), metabolisme bakteri dalam mereduksi Se digolongkan sebagai reaksi disimilasi atau penguraian. Mekanisme dalam reaksi ini adalah senyawa selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) diurai menjadi selenium elemental ( $\text{Se}^0$ ) dengan unsur selenium sebagai penerima elektron dan bakteri sebagai agen pendonor elektron.

Secara umum reaksi reduksi selenium diawali dengan merubah senyawa selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) menjadi selenite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) dengan perantara SerABC yang merupakan sebuah enzim hasil dari sekresi membran periplasmik bakteri, yaitu *selenite reductase* dengan perannya membantu menyediakan elektron untuk didonorkan yang reaksi tersebut terjadi pada membran periplasmik (Gambar 2.2 (a)). Sementara senyawa selenite yang telah terbentuk akan direduksi menjadi selenium. SerABC berperan sebagai pengatur metabolisme *heme* (type-b), unsur zat besi (Fe), sulfur (S), dan molybdenum (Mo) yang masuk dalam sel (Dridge *et al.*, 2007).



Gambar 2.2 Transformasi Selenium pada dinding sel *Thauera selenatis*. **a** (1) Selenate memasuki sel melalui dinding sel; (A) reduksi selenate menjadi selenite dalam ruang periplasmik, dikatalisis oleh *selenite reductase*, SerABC; (B) reduksi selenite menjadi selenium elemental dalam ruang periplasmik, dikatalisis oleh *nitrit reductase*, NIR; (C) ekstrusi selenium elemental yang dilapisi dengan lapisan biopolimer ke lingkungan ekstraseluler (Macy *et al.*, 1993); **b** (1) selenate memasuki sel melalui dinding sel; (2) reduksi selenate menjadi selenite dalam ruang periplasmik, dikatalisis oleh *selenite reductase*, SerABC; (3) transportasi selenite di dalam sitoplasma; (4) reduksi selenite menjadi selenium unsur yang dimediasi oleh tiol (Glutathione, GSH); (5) ekstrusi selenium elemental yang dilapisi dengan lapisan biopolimer ke lingkungan ekstraseluler (Debieux *et al.*, 2011).

## 2.8 Teknik Identifikasi Molekuler dan Filogenetik

### 2.8.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA. Isolasi DNA merupakan langkah yang tepat untuk mempelajari DNA. Prinsipnya ada dua, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Sentrifugasi merupakan teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul. Molekul yang mempunyai berat molekul besar akan berada di bagian bawah tabung dan molekul ringan akan berada pada bagian atas tabung (Abinawanto, 2011).

Faatih (2009) Lisis sel bekerja dengan cara merusak dinding dan membran sel yang bertujuan mengeluarkan isi sel. Lemak adalah struktur utama pembentuk membran dan dinding sel. Detergen atau garam dapur yang diberikan pada sel dapat melubangi dan merusak sel sehingga isi inti sel (DNA) bisa keluar. Proses setelah lisis sel adalah presipitasi. Presipitasi dilakukan dengan etanol, kloroform, isopropanol ataupun fenol yang bertujuan untuk memisahkan DNA dengan residunya. DNA yang terpresipitasi akan terpisah dari residu berupa RNA dan protein yang tersisa. Pada saat proses etanol dibuang dan pellet dikeringanginkan dalam tabung, pellet kering yang berada di dalam tube adalah DNA pekat (Bettelheim dan Landesberg, 2007). Etanol atau alkohol tidak melarutkan DNA dan berat jenis alkohol yang lebih ringan dari air membuat DNA naik di permukaan (Faatih, 2009).

Presipitasi bertujuan untuk menghilangkan residu-residu yang berasal dari tahapan ekstraksi (Yuwono, 2006). Pencucian pellet yang dipresipitasi menggunakan etanol bertujuan untuk menghilangkan residu residu garam yang masih tersisa (Keller dan Mark, 1989). Garam yang terlibat pada saat proses ekstraksi berlangsung memiliki sifat yang sukar larut dalam isopropanol sehingga dapat terpresipitasi bersama DNA, oleh sebab itu dibutuhkan presipitasi kembali dengan etanol sebagai tahap akhir untuk menghilangkan residu garam (Ausubel *et al.*, 2003) Setelah dilakukan proses presipitasi (pemisahan) selanjutnya adalah proses purifikasi (pemurnian). Purifikasi dilakukan dengan pencucian ulang etanol yang kemudian etanol dibuang dan pellet dikeringanginkan. Tujuan dari perlakuan tersebut adalah untuk menghilangkan residu etanol dari pelet DNA. Penghilangan residu etanol dilakukan dengan cara evaporasi karena sifat etanol mudah menguap di udara (Surzycki, 2000).

### **2.8.2 Amplifikasi DNA**

Tahap lanjutan dari isolasi DNA adalah amplifikasi DNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). Teknik tersebut dapat bermanfaat dalam memperbanyak jumlah DNA agar dapat dimanfaatkan lebih maksimal karena jumlahnya lebih banyak (Handoyo, 2011). PCR (Polymerase Chain Reaction) adalah teknik *in vitro* untuk perbanyak (amplifikasi) potongan DNA pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida (Faatih, 2009). PCR dapat dipengaruhi oleh faktor komposisi larutan buffer ataupun jumlah siklus reaksi yang dilakukan (Yuwono, 2006). Menambahkan bahwa proses PCR terdapat siklus annealing dimana pengaturan suhu dari siklus tersebut sangat

berpengaruh pada proses pelekatan primer. perbedaan suhu satu derajat dapat menyebabkan primer gagal untuk melekat (Langga, 2012).

### 2.8.3 Elektroforosis Gel Agarose

Hasil dari PCR dapat dilihat pada elektroforosis gel untuk mengetahui visualisasi dari tahapan-tahapan sebelumnya dan mengetahui berat molekul dari pita DNA target (Handoyo, 2011). Prinsip dasar dari elektroforosis adalah memisahkan molekul DNA berdasarkan perbedaan ukuran. Elektroforosis menggunakan muatan listrik dengan tegangan (voltase) dalam proses kerjanya dan pemisahan DNA dilakukan dengan gel agarose (Firdausi dan Kusumawati, 2008)

### 2.8.4 Squencing DNA

Metode Sanger adalah metode yang digunakan untuk *Sequencing*. Metode ini dikenal juga sebagai metode terminasi rantai dideoksi yang menghasilkan kumpulan fragmen basa nukleotida. *Sequencing* dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida arginin(A), sitosin(C), guanin(G), timin(T) pada molekul DNA bakteri. *Sequencing* metode Sanger menggunakan larutan berupa dNTPs (Deoxynucleotides Triphosphates) untuk mensintesis molekul DNA baru bakteri dan ddNTPs (Dideoxynucleotides Triphosphates) yang akan menghentikan pemanjangan molekul DNA bakteri pada basa tertentu (Hunkapiller, 1992).

Penemuan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) oleh Sanger sangat menguntungkan pada perkembangan biologi molekuler. Proses untuk *sequencing* DNA tadinya harus melewati serangkaian proses yang panjang dan melelahkan. Dengan adanya metode yang dikembangkan oleh Sanger dan Maxam-Gilbert ini

*sequencing* dapat dilakukan dengan sangat mudah dan cepat sehingga teknologi ini semakin berkembang (Muladno, 2002).

## **2.9 Analisis Filogenik**

Filogenetik adalah ilmu tentang hubungan antara organisme berdasarkan kekerabatan satu sama lain, hubungan evolusi, dan juga sejarah kehidupan suatu spesies (Brown, 2002). Pohon filogenetik dapat menggambarkan hubungan antar spesies dengan moyang terakhir yang paling dekat dengan spesies pembanding. Sehingga dapat dianalisis kedekatan suatu spesies dengan spesies lainnya (Kocher *et al.*, 1989).



## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kuantitatif dan eksperimental. Jenis diskriptif eksperimental dikarenakan data yang disajikan meliputi bakteri resisten terhadap selenate, karakteristik makroskopis, serta identifikasi spesies bakteri dengan teknik molekuler 16S rRNA dan rekonstruksi pohon filogenetik. Jenis eksperimental dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat terpilih dalam mengakumulasi logam Selenate pada konsentrasi selenate tertentu.

### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus - Desember 2019. Bertempat di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Genetika dan Molekuler serta Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Uji analisis hasil PCR (*sequencing*) dilakukan oleh PT. Bioneer di Korea Selatan.

### **3.3 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.4.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, gelas erlenmayer, gelas ukur, neraca analitik, mikropipet, *Laminar Air Flow* (LAF), *Autoclaf*, hot plate, bola hisab, pipet kaca, blue tip, yellow tip, Stirer, alat destruksi, Bunsen, ose, batang kaca L (spreader), ikubator, tabung endorff, beaker glass, stirrer, tabung reaksi, *coloni counter*, plastik, corong, karet gelang,

aluminium foil, botol, spatula, PCR Thermal Cycler, lemari pendingin -20°C, elektroforesis dengan power supply, Gel-Doc Transilluminator, *microwave*, dan shaker inkubator.

### 3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini antara lain *Yeast Malt Extract Agar* (YMEA) yang mengandung 3 gr yeast ekstrak, 3 gr malt ekstrak, 5 gr pepton, 5 gr sukrosa, 20 gr agar bacteria dalam 1000 ml aquades,  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  (sodium selenate), Sedimen Mangrove Pantai Banyuglugur, Situbondo, Aquades steril, NaCl, alkohol 70%, plastik wrap, tissue, spirtus, kapas, kasa, kertas label, plastik, kristal violet, safranin, alkohol 96%, nuclease free water, sukrosa, loading dye, 2,5 taq polymerase, natrium selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ), pcr mix, dNTP, GeneRuler™ 1 Kb Ladder (Intron), ethidium bromide (EtBr), gel agarosa 1 % dan menggunakan Primer 306 forward {5' CCA GAC TCC TAC GGG AGG CAG C 3'} dan Primer 935 reverse {5' CGA ATT AAA CCA CAT GCT CCA C 3'}.

## 3.4 Prosedur Kerja

### 3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat gelas yang digunakan dicuci bersih menggunakan sabun kemudian di keringkan. Beberapa alat seperti cawan petri di bungkus menggunakan kertas putih dan beberapa alat yang lain di bungkus menggunakan aluminium foil. Untuk bahan berupa media agar dimasukkan ke dalam gelas erlenmayer 500ml kemudian di tutup menggunakan kapas dan kassa, sedangkan

larutan garam fisiologis dimasukkan ke dalam tabung reaksi 20 ml yang masing-masing ditutup menggunakan aluminium foil. Seluruh alat dan bahan dimasukkan dalam kantong plastik yang berbeda yang kemudian diikat menggunakan karet gelang. Sterilisasi alat gelas dan bahan selain media agar dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sedangkan pada media agar dilakukan 2 kali sterilisasi menggunakan alat yang sama.

### 3.4.2 Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari sedimen mangrove di Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo di 3 stasiun yang berbeda. Stasiun pertama merupakan lokasi yang dekat dengan aktifitas penduduk. Stasiun kedua merupakan lokasi yang jarang digunakan kegiatan penduduk. Sedangkan lokasi ketiga merupakan lokasi yang berada jauh dari kegiatan penduduk. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil bagian permukaan sedimen dari mangrove. Sampel sedimen diambil menggunakan sekop kecil, kemudian dimasukkan dalam plastik dan diberi label, kemudian disimpan pada kotak es (*ice box*). Sampel yang didapat kemudian dibawa menuju laboratorium untuk di isolasi dan diidentifikasi bakterinya.

### 3.4.3 Pembuatan Media

#### a) Media Pertumbuhan

Media yang digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri dari sedimen mangrove adalah media *Yeast Media Extract Agar* (YMEA). Menurut Krutzman dan Fell (1998) dalam 1000 ml terdiri dari 3 gr *yeast extract*, 3 gr *malt extract*, 5

gr pepton, 5 gr sukrosa, 20 gr *agar bacteria* yang dilarutkan dalam 1000 ml aquades. Setelah itu, bahan dimasukkan ke dalam tabung erlenmayer 1 L kemudian ditutup dengan menggunakan aluminium foil. Media kemudian di masak atau di panaskan diatas *hot plate* sampai media terlihat mendidih dan homogen. Media kemudian disterilisasi menggunakan alat autoklaf selama 2x15 menit dengan suhu 121° C 1 atm.

Penuangan media dilakukan secara steril di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Media dimasukkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 19,8 ml media panas menggunakan pipet kaca dan bola hisap steril. Penambahan Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> (sodium selenate) dengan konsentrasi 0 mM, 1 mM, 2 mM, 5mM, 10mM dilakukan bersamaan saat penuangan media YMEA pada cawan petri. Cawan petri berisi media didiamkan selama 1x24 jam pada suhu inkubator 37° C untuk mengetahui kontaminan dari bakteri.

#### b) **Media Isolasi**

Media isolasi bakteri yang digunakan untuk metode serial delution adalah 1 ml aquades steril, kemudian dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml steril.

#### **3.4.4 Isolasi Bakteri**

Isolasi bakteri dilakukan dengan cara diambil 0,5 gr sedimen mangrove menggunakan spatula steril. Sedimen kemudian dilarutkan pada 1 ml aquades steril dalam tube 1,5 ml, lalu di homogenkan selama 10 detik. Setelah itu, diambil 100 µl dari tube pertama menggunakan mikropipet dan dipindahkan ke dalam tube berikutnya. Langkah yang sama dilakukan sampai pada tube ke 3. Proses

isolasi bakteri pada media YMEA dilakukan dengan metode *streak plate*. Sebanyak 30 mikroliter aquades berisi sedimen dalam tube kemudian diambil menggunakan mikropipet dan di inokulasikan ke dalam cawan petri berisi media YMEA dengan konsentrasi yang berbeda. Dilakukan *streak* menggunakan spreader steril di dalam lemari LAF. Cawan berisi sampel diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 27° C selama 3x24 jam sampai terlihat koloni bakteri pada cawan petri.

#### **3.4.5 Uji Resistensi Bakteri**

Penelitian dilanjutkan dengan uji resistensi atau juga bisa disebut uji skrining sebagai langkah mengetahui seberapa besar isolat bakteri yang mampu tumbuh terhadap paparan logam berat selenate dan kemampuan isolat bakteri mereduksi logam selenate yang diberikan. Menurut Amalia (2017), uji ini dilakukan dengan menuang 30 µL sampel ke dalam media YMEA yang mengandung 10 mM sodium selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) yang telah dilakukan masa inkubasi selama 24 jam. Menurut Avendano *et al.*, (2016), bakteri dinyatakan positif mereduksi dan mengakumulasi ketika berwarna merah dan dikatakan negatif jika berwarna putih.

#### **3.4.6 Identifikasi Bakteri**

##### **3.4.6.1 Pengamatan Makroskopis**

Karakteristik bakteri dari hasil isolasi pada media YMA diamati sifat-sifat pertumbuhannya. Sifat-sifat yang diamati menurut Dwijoseputro (1994) adalah:

- a. Bentuk koloni tampak atas yang meliputi: bulat (*circular*), berbenang (*filamentous*), tak teratur (*irregular*), menyerupai akar (*rhizoid*), dan serupa kumbaran (*spindle*).
- b. Permukaan koloni atau elevasi yang dilihat dari samping antara lain meliputi rata (*flat*), timbul datar (*raised*), timbul-melengkung (*convex*), dan membukit atau *umbonate*.
- c. Bagian tepi koloni tanpak dari atas yang meliputi: utuh (*entire*), berombak (*lobate*), bergerigi (*serrate*), berbenang (*filamentous*), dan keriting (*undulate*).

#### **3.4.6.2 Pengamatan Mikroskopis**

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan melihat bentuk sel dan warna bakteri setelah dilakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram bakteri mengacu pada prosedur yang dilakukan Cappucino (2013), yaitu diambil satu ose bakteri dari media dan diletakkan pada objek glass steril yang telah ditetesi aquades dibagian atasnya. Preparat kemudian difiksasi sampai kering dan setelah kering ditetesi larutan kristal violet. Preparat kemudian didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan aquades mengalir. Langkah berikutnya di tetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu diberi aquades mengalir yang kemudian diberi alkohol 96%. Kemudian preparat ditetesi safranin dan didiamkan selama 1 menit yang selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan menggunakan tissue. Preparat kemudian diamati menggunakan mikroskop, apabila terlihat berwarna ungu maka termasuk gram positif, jika terlihat warna merah maka termasuk pada bakteri gram negatif.

### 3.4.6.3 Pengamatan Molekuler

#### a. Amplifikasi dengan Direct PCR

Proses amplifikasi gen penyandi 16S rRNA dari bakteri resisten dan pengakumulasi selenate dilakukan dengan metode *Direct PCR Amplification*, yaitu mengambil koloni tunggal bakteri pada cawan petri dengan menggunakan ujung tusuk gigi steril, kemudian dipindahkan ke dalam dasar tube PCR dan ditambah bahan antara lain PCR mix 12  $\mu$ L, Primer forward 1  $\mu$ L 10 pmol, primer reverse 1  $\mu$ L 10 pmol, nucleus free water 9,5  $\mu$ L. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah 306F (5'-CCA GAC TCC TAC GGG AGG CAG C-3 ') sebagai forward primer dan 935R (5'-CGA ATT AAA CCA CAT GCT CCA C-3 ') sebagai reverse primer.

Proses ini menggunakan fase denaturasi awal di suhu 94° C selama 2 menit, denaturasi 94° C selama 30 detik, proses annealing dengan suhu 50° C 40 detik, elongasi pada suhu 72° C selama 40 detik dan pemantapan 72° C selama 2 menit. Proses denaturasi, annealing dan polimerisasi sebanyak 30 siklus.

#### b. Uji Kualitas DNA

Uji ini dengan cara 250 mL larutan buffer TBE 1x dicampur dengan 5 mL TBE 50x dalam 245 mL aquades. Gel agarosa 1% dibuat dengan 0,3 gr agarosa dilarutkan ke dalam buffer TBE 1x hingga volum 40 mL. Sebanyak 10  $\mu$ L sampel DNA dan 2  $\mu$ L loading dye 6x dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dilakukan pada voltase 100 V dan waktu running 30 menit. Kemudian hasil elektroforesis di lihat dngan menggunakan alat *Gel doc*.

### c. Sekuensing Gen Penyandi 16S rRNA

Hasil amplifikasi kemudian dilakukan *sequencing* menggunakan jasa Bioneer Korea Selatan.

#### 3.4.7 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dengan cara mengukur *optical density* (OD) setiap 2 jam sekali dari 3 ml media YMEB cair yang telah diinokulasikan 30 $\mu$ l kultur bakteri menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 600 nm. Larutan standart yang digunakan adalah *YM broth*. Uji ini dilakukan sampai didapatkan 4 fase dari pertumbuhan bakteri.

#### 3.4.8 Analisis Data

Hasil molekuler dianalisis secara deskriptif dan kualitatif berdasarkan kualitas DNA gen 16S rRNA menggunakan elektroforesis dengan primer 306F dan 935R. Hasil *sequencing* kemudian dianalisis menggunakan web NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) secara online, program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*), dan program MEGA 6 (Haddad *et al.*, 2014). Analisis integrasi Sains dan Islam juga dilakukan menggunakan nalar spiritual dan kajian keislaman yang berkaitan dengan penelitian yang berpedoman pada Al-Quran dan Al Hadist.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Jenis Bakteri Resisten Selenate pada Sedimen Mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo berdasarkan Karakteristik Morfologi dan Molekuler

#### 4.1.1 Isolasi Bakteri Resisten Selenate

Pengambilan sampel dilakukan di daerah pesisir pantai Banyuglugur Situbondo. Dalam pengambilan sampel, bakteri diperoleh dari bagian atas sedimen mangrove yang kemudian dilakukan isolasi menggunakan media *Yeast Media Extract Agar* (YMEA). Media tersebut digunakan sebagai bahan isolasi bakteri dikarenakan menurut Kashiwa *et al.*, (2001) media YMEA mengandung bahan sebagai faktor pertumbuhan bakteri, seperti asam casamino dan vitamin. Selain itu juga terdapat glukosa 20 gr/L yang berperan sebagai sumber karbon yang digunakan untuk propagasi sel bakteri.

Sampel bakteri diisolasi dan ditumbuhkan dalam 15 ml media YMEA dengan pemberian sodium selenate 0 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM dan 10 mM menggunakan metode *spread plate*. Bakteri yang telah diinokulasikan ke dalam media kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu 27° C (suhu ruang) secara aerobik. Berdasarkan inkubasi sampel isolasi bakteri selama 3 hari, diperoleh hasil seperti pada tabel 4.1. Bakteri dengan indikator warna merah menunjukkan adanya dugaan kemampuan dalam mereduksi logam selenate (Se VI) menjadi selenium elemental (Se 0). Pada hasil tersebut, terlihat pada media dengan perlakuan konsentrasi selenate 10 mM dan 5 mM, didapatkan masing-masing 2 koloni bakteri yang berwarna merah. Sedangkan pada perlakuan 2 mM terdapat 4 koloni berwarna merah. Menurut Tomei *et al.*, (1995) perubahan warna merah

diakibatkan adanya proses metabolisme dari dinding sel bakteri yang resisten terhadap logam selenate.

Tabel 4.1 Hasil Isolasi Bakteri

| No. | Pengenceran Sampel | Konsentrasi Selenate pada Media | Jumlah Koloni |       |
|-----|--------------------|---------------------------------|---------------|-------|
|     |                    |                                 | Putih         | Merah |
| 1.  | $10^{-2}$          | 0 mM                            | 8             | -     |
|     |                    | 1 mM                            | 3             | -     |
|     |                    | 2 mM                            | 10            | -     |
|     |                    | 5 mM                            | -             | -     |
|     |                    | 10 mM                           | -             | -     |
| 2.  | $10^{-3}$          | 0 mM                            | 15            | -     |
|     |                    | 1 mM                            | 4             | 1     |
|     |                    | 2 mM                            | 5             | 4     |
|     |                    | 5 mM                            | 1             | 1     |
|     |                    | 10 mM                           | -             | 2     |

Keterangan: ■ yang menjadi fokus penelitian.

Alasan pemilihan isolat bakteri yang tumbuh pada konsentrasi 5 mM dan 10 mM untuk menjadi fokus penelitian adalah dikarenakan pada peremajaan dengan menggunakan media YMEA 10 mM selenate, lima dari delapan isolat bakteri yang didapatkan berwarna merah (tabel 4.1) tidak menunjukkan warna merah kembali ataupun ciri yang menunjukkan adanya aktivitas bakteri terhadap selenate pada media 10 mM. Perlakuan dengan peremajaan pada media 10 mM dimaksudkan untuk mencari bakteri yang paling resisten terhadap logam selenate dalam konsentrasi tertinggi. Hasil peremajaan yang diperoleh pada media YMEA, kelima isolat bakteri tersebut menunjukkan warna putih, sehingga didapatkan pada tahap ini tiga isolat bakteri, yaitu 1 isolat dari 5 mM dan 2 isolat dari 10 mM (lihat tabel 4.2). Menurut Khalilian, *et al.*, (2015) perubahan warna isolat bakteri menjadi merah pada media yang diberi selenate dengan konsentrasi 10 mM menunjukkan bahwa pada bakteri tersebut terjadi proses pengurangan selenate

serta menunjukkan adanya daya tahan serta kemampuan mengakumulasi logam selenate oleh bakteri terhadap logam dalam media.

#### **4.1.2 Identifikasi Makroskopis**

Pengamatan makroskopis dilakukan terhadap bakteri yang memberikan respon berwarna merah pada pengujian resistensi pada konsentrasi tinggi dalam media padat. Bakteri yang diamati adalah bakteri yang menunjukkan warna merah pada media peremajaan YMEA dengan konsentrasi tertinggi yakni 10 mM. Berdasarkan tabel sebelumnya (tabel 4.1), didapatkan isolat yang menjadi fokus penelitian ini adalah bakteri dengan 3 isolat yang berasal dari 5 mM dan 10 mM. Hal ini dikarenakan dalam peremajaan isolat bakteri pada media selenate konsentrasi 10 mM, hanya 3 isolat saja yang menunjukkan perubahan warna merah pada pengamatan 3x24 jam di suhu ruang.

Pengamatan makroskopis bakteri dilakukan dengan cara pengamatan langsung pada cawan petri. Pemeriksaan makroskopis dinilai dari warna koloni, warna tepi koloni, bentuk tepi koloni, dan permukaan koloni. Hasil pengamatan yang didapatkan dari pengamatan makroskopis dapat dilihat seperti pada tabel 4.2. Bakteri yang diamati makroskopis, kemudian dilakukan pengamatan dengan cat gram untuk mengetahui bakteri tersebut merupakan golongan bakteri gram positif atau bakteri dengan gram negatif.

Tabel 4.2 Karakteristik Isolat Bakteri Resisten Selenate pada media 10 mM

| Koloni Bakteri | Morfologi Koloni |            |               |                  |
|----------------|------------------|------------|---------------|------------------|
|                | Warna Koloni     | Warna Tepi | Tepi Koloni   | Permukaan koloni |
| Isolat A-5-1   | Merah            | Merah      | <i>entire</i> | <i>convex</i>    |
| Isolat B-10-1  | Merah            | Merah      | <i>entire</i> | <i>convex</i>    |
| Isolat B-10-2  | Merah            | Merah      | <i>entire</i> | <i>raised</i>    |

Berdasarkan hasil pengamatan didapatkan bahwa pada ketiga yang diamati pada media YMEA dengan konsentrasi 10 mM, ketiga isolat memiliki warna merah pada bagian tengah dan juga pada bagian tepi. Permukaan isolat A-5-1 dan isolat B-10-1 memiliki bentukan permukaan timbul-melengkung (*convex*), sedangkan pada isolat B-10-2, didapatkan bentukan permukaan isolat timbul datar (*raised*). Menurut Sousa, *et al.*, (2013) perbedaan dalam penampilan koloni dapat dijadikan ciri khas untuk membedakan mikroorganisme pada tingkat berbagai kelompok taksonomi, termasuk strain dari satu spesies. Namun yang menjadi hal terpenting, semua karakteristik dari mikroorganisme tergantung pada kondisi saat penumbuhan atau saat peremajaan, terlebih pada komposisi media tumbuh, suhu, dan juga waktu pertumbuhan. Akan tetapi menurut Puchkov (2016), menjelaskan bahwa penampilan koloni tidak bisa menjadi satu-satunya parameter yang digunakan untuk identifikasi suatu dari suatu mikroorganisme.

#### 4.1.3 Pengamatan Gram Bakteri

Pengamatan Gram pada bakteri dilakukan dengan menggunakan pewarna cat Gram. Pewarnaan Gram pada bakteri bertujuan untuk membedakan bakteri jenis Gram positif atau Gram negatif yang didasari oleh struktur dinding sel

(Waluyo, 2005). Hasil pengamatan pewarnaan cat Gram bakteri pada perbesaran 1000 kali, didapatkan ketiga isolat memiliki ciri Gram positif dengan ditandai terlihatnya warna ungu saat pengamatan (tabel 4.3 dan gambar 4.1). Selain itu, ketiga isolat memiliki bentuk basil atau batang dengan memiliki ukuran panjang yang berbeda-beda. Dwidjoseputro (1994) menjelaskan bahwa bakteri dengan bentukan basil atau batang dapat teramati sebagai batang tunggal atau juga dapat bergandengan dengan batang lain. Secara jamak, *bacillus* disebut *bacilli* dan beberapa *bacilli* akan menyerupai *cocci* atau disebut *coccobacilli*.

Tabel 4.3 Karakteristik Hasil Cat Gram pada Bakteri

| Koloni Bakteri | Ukuran | Bentuk sel | Jenis Gram |
|----------------|--------|------------|------------|
| Isolat A-5-1   | 4,1 mm | Batang     | Positif    |
| Isolat B-10-1  | 3 mm   | Batang     | Positif    |
| Isolat B-10-2  | 2,4 mm | Batang     | Positif    |



(a)(b)(c)

Gambar 4.1 Pewarnaan Gram pada bakteri; (a) Isolat A-5-1; (b) Isolat B-10-1; (c) Isolat B-10-2

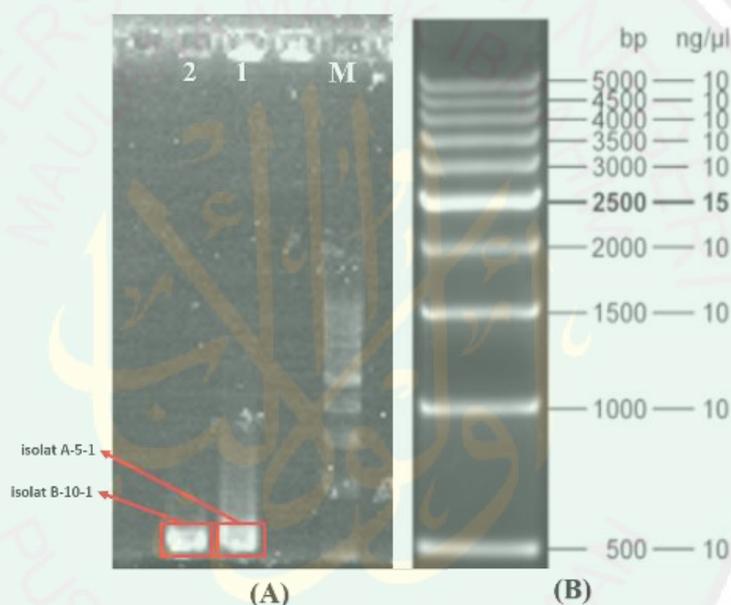
Berdasarkan peneliti yang dilakukan oleh Javed, *et al.*, (2016) diketahui bahwa bakteri dengan Gram positif menghasilkan spora dalam kondisi yang

kurang menguntungkan dalam pertumbuhannya. Nasrazadani, *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa bakteri dengan Gram positif memiliki ketahanan tertinggi terhadap logam berat. Hal itu dikarenakan kemampuannya yang tinggi untuk menyerap dan menahan logam pada permukaan dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang lebih sederhana dan tidak spesifik pada pintu masuk dan keberadaan bahan eksternal. Kontak jangka panjang bakteri dengan logam berat dapat menyebabkan lebih banyak resistensi dan hal ini merupakan alasan utama tingkat toleransi bakteri yang tinggi terhadap logam berat.

#### 4.1.4 Identifikasi Molekuler

Identifikasi molekuler dilakukan dengan cara isolasi DNA yang kemudian dilanjutkan dengan tahap PCR. Kedua sampel bakteri yang diduga dapat resisten dan akumulatif pada penelitian ini selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA dan dilanjutkan ke tahap running PCR dengan menggunakan Primer 306 forward {5' CCA GAC TCC TAC GGG AGG CAG C 3'} dan Primer 935 reverse {5' CGA ATT AAA CCA CAT GCT CCA C 3'}. Isolat bakteri yang digunakan adalah dua bakteri yang menunjukkan perubahan warna saat dilakukan uji resistensi dalam media cair konsentrasi 10 mM (gambar 4.6). Isolat bakteri B-10-2 dihasilkan gumpalan dalam media cair dan tidak menunjukkan perubahan warna merah seperti pada isolat A-5-1 dan B-10-1 pada media cair. Hal itu dikarenakan menurut Khalilian, *et al.*, (2014) perubahan warna menjadi merah atau kuning kemerahan menandakan terjadi proses pengurangan kadar logam berat selenium toksik menjadi selenium elemental oleh bakteri.

Berdasarkan hasil amplifikasi fragmen DNA gen 16s RNA, memberikan hasil yang baik pada suhu penempelan primer pada suhu 50° C dengan terlihatnya garis pita DNA pada sampel isolat A-5-1 dan sampel isolat B-10-1, dan pada sisi sebelah kiri agar, terlihat pita-pita dari marker sepanjang 500 bp. Terlihat pada gambar 4.2, pita DNA isolat A-5-1 dan isolat B-10-1 terdapat pada kisaran amplicon 600-500 bp pada marker. Hasil amplifikasi DNA menggunakan PCR kemudian dimurnikan dan disekuensing untuk mendapatkan urutan basa-basa nukleotidanya.



Gambar 4.2 (A). Panjang Basepair Marker Gene Ladder Jane B; (B) Elektrofotogram produk PCR pada gel agarose 1%; M= Marker 500bp; 1= isolat A-5-1; 2= isolat B-10-1. (Doc pribadi, 2019);

Pita hasil PCR terlihat jelas pada gel agarose 1% menunjukkan bahwa konsentrasi DNA dari hasil isolasi cukup tinggi sehingga tervisualisasikan pada gel menggunakan alat trans-UV (*gel doc*). Hal ini menurut Langden (2017), pita plasmid terlihat tebal dan jelas menunjukkan bahwa konsentrasi dari plasmid hasil isolasi cukup tinggi.

#### 4.1.5 Analisis Filogenetik

##### a. Keidentikan Spesies

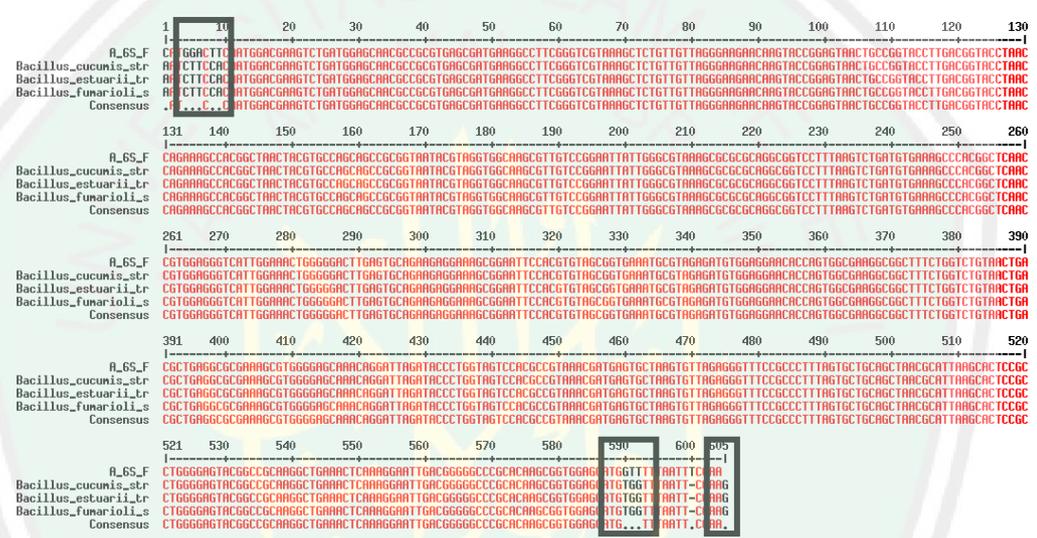
Penyamaan hasil sekuen dari bakteri dilakukan dengan menggunakan Blast pada laman online NCBI. Hasil pensejajaran menunjukkan pada Isolat A-5-1 memiliki kemiripan dengan 3 jenis bakteri yaitu *Bacillus cucumis* strain PK15, *Bacillus fumarioli* strain PF1, dan *Bacillus aestuarii* strain IAE10 yang sama-sama memiliki persentase kemiripan 98,83%. Sedangkan pada Isolat B-10-1 didapatkan 3 jenis bakteri yang berbeda, yaitu *Klebsiella oxytoca* strain Rizhao 567.2; *Klebsiella oxytoca* strain Rizhao 615.1; dan *Klebsiella oxytoca* strain Rizhao 615.1 dengan kemiripan 89,69%.

Tabel 4.4 Hasil Blast isolat Bakteri

| No. | Sampel Bakteri          | Jenis Bakteri Identik                         | NCBI Accession | % Kesamaan |
|-----|-------------------------|---|----------------|------------|
| 1.  | Isolat A-5-1 (A-16S F)  | <i>Bacillus cucumis</i> strain PK15           | MK519225.1     | 98.83%     |
|     |                         | <i>Bacillus fumarioli</i> strain PF1          | MK909907.1     | 98.83%     |
|     |                         | <i>Bacillus aestuarii</i> strain IAE10        | MK414790.1     | 98.83%     |
| 2   | Isolat B-10-1 (B-16S F) | <i>Klebsiella oxytoca</i> strain Rizhao 567.2 | MN249586.1     | 89,69%     |
|     |                         | <i>Klebsiella oxytoca</i> strain Rizhao 615.1 | MN249590.1     | 89,69%     |
|     |                         | <i>Klebsiella oxytoca</i> strain Rizhao 614.1 | MN249589.1     | 89,69%     |

Persentase yang didapat dari isolat A (98,83%) didasarkan pada kesamaan urutan nukleotida pada masing-masing spesies dengan nukleotida pada isolat A-5-1. Artinya terdapat 1,17% yang menyebabkan homologi pada isolat A berbeda dengan ketiga spesies lain. Sekuen dianalisis menggunakan lama *online* Multalin

v.5.4.1 ([multalin.toulouse.inra.fr/multalin/](http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/)) dan didapatkan hasil terdapat perbedaan urutan nukleotida. Perbedaan tersebut terlihat pada masing-masing ujung dari urutan nukleotida (posisi 1, 4, 5, 6, 8, 9, 590, 591, 592, dan 605) (gambar 4.3). Sementara pada isolat B-10-1 memiliki perbedaan 10,31% dengan ketiga bakteri hasil Blast. Perbedaan nukleotida pada isolat B-10-1 nampak terdapat 41 titik perbedaan yang tersebar pada ujung sekuens serta di bagian tengah sekuens (gambar 4.4).



Gambar 4.3 Penjajaran hasil Blast sekuens isolat A-5-1 menggunakan laman *online* Multalin v5.4.1



Gambar 4.4. Penjajaran hasil Blast sekuens isolat B-10-1 menggunakan laman online Multalin v5.4.1

Jhonson, (1984) menjelaskan spesies dikatakan sama adalah ketika homologi DNA yang dimiliki suatu spesies tersebut memiliki persentase homologi (kesamaan) berkisar 60-100%. Sedangkan suatu spesies dikatakan berkerabat dekat dengan spesies lain adalah ketika memiliki homologi DNA sebesar 20-60%, dan apabila homologi DNA suatu spesies tersebut memiliki persentase homologi kurang dari angka 20% maka spesies tersebut dianggap spesies yang berbeda. Sedangkan pada Kwaśna, et al (2008) menjelaskan bahwa perbedaan 3% pada persentase kesamaan menunjukkan perbedaan pada level spesies.

Spesies bakteri *outgroup* yang dipilih memiliki karakter yang cukup berbeda sehingga dipilih dari kelas yang berbeda dari hasil BLASS Isolat A-5-1 dan Isolat B-10-1, yaitu *Salmonella enterica* dari kelas Gammaproteobacteria. Menurut Mount (2008) Pemilihan sekuen *outgroup* yang terlalu jauh akan menyebabkan analisis pohon filogenetik menjadi salah dan tidak akurat akibat dari perbedaan

yang random dan terlalu banyak diantara sekuen outgroup dengan sekuen ingrup. Sementara menurut Muzzayinah (2012) *outgroup* dipilih dari yang memiliki hubungan kekerabatan dekat dengan *ingrup* tetapi tidak sedekat kelompok *ingrup*. *Outgroup* diperlukan dalam analisis filogenetik karena bertujuan untuk mengetahui karakter primitif (*plesiomorf*) dan karakter derivat (*apomorf*) dari kelompok *ingroup* dan juga menentukan titik awal pembentukan sebuah pohon filogenetik.

#### **b. Jarak Genetik Isolat Bakteri**

Jarak genetik dari sekuens bakteri dilakukan menggunakan aplikasi MEGA 6. Dokumen fasta dari kesembilan sekuens terlebih dahulu dilakukan penggabungan data menggunakan aplikasi *BioEdit* dan kemudian dokumen disimpan dengan jenis file Mega (.mega). Dokumen kemudian dibuka dalam aplikasi MEGA 6 yang kemudian pada basa sekuens dikedua ujung sekuens dilakukan pemotongan hingga batas ujung basa sekuens sampel (Isolat A-5-1 dan Isolat B-10-1) terpendek. Proses penyejajaran dilakukan dengan *ClustalW Multiple alignment*. Menurut Tamura *et al.*, (2011) *ClustalW* merupakan sistem yang digunakan secara luas dalam mensejajarkan sekuen nukleotida dengan metode progresif. Sekuens homolog dengan nilai terbaik disejajarkan terlebih dahulu, diikuti sekuens yang berjarak kemiripan lebih jauh hingga penyejajaran global diperoleh.

File yang telah disimpan dengan jenis .mega kemudian buka dan dilakukan pemodelan untuk mengetahui metode yang tepat dalam mengetahui jarak genetik

dari suatu sampel atau spesies. Berdasarkan hasil permodelan didapatkan 24 model yang dapat digunakan dalam menganalisis jarak genetik dari sekuens bakteri tersebut, dan model terbaik menggunakan model HKY (*Hasegawa-Kishino-Yano*). Model terbaik yang digunakan dilihat dari skor BIC (*Bayesian Information Criterion*). Nei dan Kumar (2000) menjelaskan semakin kecil skor BIC dalam analisis model, maka semakin disarankan dalam melakukan analisis jarak genetik maupun pohon filogenetik.

Berdasarkan hasil analisis menggunakan aplikasi MEGA6, didapatkan hasil jarak genetik dari bakteri pada tabel 4.5. Menurut Dwiko (2018), hasil perhitungan dari jarak genetik menunjukkan nilai kedekatan hubungan antar spesies. Sedangkan menurut Afryani (2014) apabila nilai jarak genetik mendekati angka 0 maka dapat diartikan bahwa tidak ada variasi genetik yang signifikan. Tallei *et al.*, (2016) juga melaporkan bahwa semakin sedikit nilai jarak genetik antar organisme maka semakin dekat hubungan kekerabatan diantara spesies tersebut.

Tabel 4.5 Jarak Genetik Antar Isolat

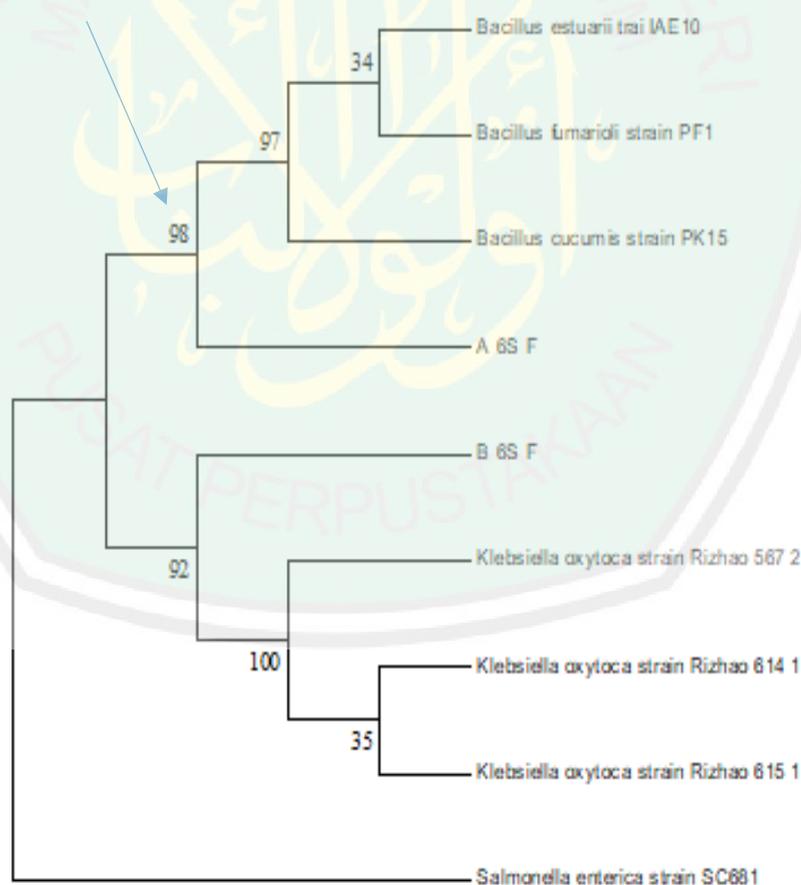
|  | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| 1. A_6S_F  |        |        |        |        |        |        |        |        |   |
| 2. B_6S_F  | 0.2879 |        |        |        |        |        |        |        |   |
| 3. <i>Bacillus_cucumis_strain_PK15</i>           | 0.0099 | 0.2808 |        |        |        |        |        |        |   |
| 4. <i>Bacillus_estuarii_strain_IAE10</i>         | 0.0099 | 0.2808 | 0.0000 |        |        |        |        |        |   |
| 5. <i>Bacillus_fumarioli_strain_PF1</i>          | 0.0099 | 0.2808 | 0.0000 | 0.0000 |        |        |        |        |   |
| 6. <i>Klebsiella_oxytoca_strain_Rizhao_567_2</i> | 0.2780 | 0.1173 | 0.2674 | 0.2674 | 0.2674 |        |        |        |   |
| 7. <i>Klebsiella_oxytoca_strain_Rizhao_615_1</i> | 0.2780 | 0.1173 | 0.2674 | 0.2674 | 0.2674 | 0.0000 |        |        |   |
| 8. <i>Klebsiella_oxytoca_strain_Rizhao_614_1</i> | 0.2780 | 0.1173 | 0.2674 | 0.2674 | 0.2674 | 0.0000 | 0.0000 |        |   |
| 9. <i>Salmonella_enterica_strain_SC681</i>       | 1.1041 | 1.1382 | 1.1041 | 1.1041 | 1.1041 | 1.0784 | 1.0784 | 1.0784 |   |

Berdasarkan hasil analisis jarak genetik menggunakan metode *Tamura 3-Parameter*, didapatkan jarak antara Isolat A-5-1 dan Isolat B-10-1 memiliki jarak kedekatan genetik sebesar 0,287 (lihat tabel 4.5). Sekuen isolat A-5-1 memiliki jarak yang sama dengan 3 spesies lain yang memiliki kemiripan 98,83% saat dianalisis menggunakan laman online NCBI yaitu berjarak 0,0099. Sedangkan untuk Isolat B-10-1, memiliki jarak genetik dengan bakteri *Bacillus estuarii* strain IAE10, *Bacillus cucumis* strain PK15, dan *Bacillus fumarioli* strain PF1 dengan jarak kedekatan genetik sebesar 0,1173. Untuk spesies hasil dari blast sekuen A-5-1 (genus *Bacillus*) memiliki jarak genetik 0,2674 dengan spesies hasil dari blast sekuen B-10-1 (genus *Klebsiella*). Spesies *outgrup* yang digunakan adalah bakteri *Salmonella enterica* strain SC681 dikarenakan memiliki ciri gram yang berbeda dengan kedua isolat hasil pengamatan. Jarak genetik strain A-5-1 dengan spesies *outgrup* adalah sebesar 1,1041 dan jarak genetik untuk strain B-10-1 sebesar 1.1382.

Kimura (1980), menyatakan bahwa pengukuran jarak genetik berfungsi membandingkan suatu sekuen DNA satu nukleotida dengan nukleotida yang lain dengan menggunakan model substitusi nukleotida. Sementara menurut Humairah (2015) melaporkan ukuran jarak genetik akan relatif dekat jika saat disilangkan tidak ada perbedaan ukuran kuantitatif angka yang signifikan karena sifat keragaman yang cukup sama. Sedangkan jarak genetik akan relatif jauh jika saat disilangkan terdapat perbedaan ukuran kuantitatif angka yang signifikan karena sifat keragaman yang berbeda.

### c. Pohon Filogenetik

Hasil dari pohon filogenetik yang diperoleh menunjukkan bahwa Isolat A-5-1 (A-16S F) memiliki kekerabatan yang dekat bakteri dengan genus *Bacillus* dan Isolat B-10-1 (B-16S F) memiliki kekerabatan yang dekat bakteri genus *Klebsiella* (gambar 4.5). Hal itu dikarenakan kedua bakteri Isolat A-5-1 ataupun Isolat B-10-1 berada dalam 1 klad yang sama dengan nilai *bootstrap* sebesar 92 untuk A dan 98 untuk B. Sedangkan spesies *Salmonella enterica* yang merupakan *outgroup* dari sampel bakteri ini membentuk cabang baru yang menunjukkan spesies primitif pada pohon filogenetik tersebut. Nilai *bootstrap* ditunjukkan pada angka yang terletak pada cabang-cabang pohon filogenetik (tanda panah).



Gambar 4.5 Pohon Filogenetik MEGA 6

Pohon filogenetik dapat diterima dalam analisis biosistematika ketika bersifat monofiletik, dikotom, tidak ada politomi, memiliki nilai *bootstrap* yang tinggi serta klad yang terbentuk konsisten dan kokoh. Kelompok monofiletik hanya mempunyai satu leluhur dan seluruh keturunannya berasal dari leluhur tersebut. Hal ini menyebabkan anggota-anggota dalam kelompok monofiletik dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat serta diasumsikan membawa sifat atau pola genetik dan biokimia yang sama (Hidayat dan Pancoro, 2008; Rahayu dan Nugroho, 2015).

Pohon filogenik merupakan grafik yang digunakan untuk menggambarkan hubungan kekerabatan antara taksa yang terdiri dari sejumlah nodus dan cabang dengan hanya satu cabang yang menghubungkan dua nodus paling berdekatan. Pola percabangan yang terbentuk dari pohon filogenetik disebut tipologi (Lie dan Graur, 1991). Analisis filogenetik tidak terlepas dari evolusi biologis yang mempelajari variasi dan perbedaan genetik antar populasi, Sedangkan untuk jarak genetik dapat dihitung berdasarkan perbedaan bahasa polimorfik suatu lokus gen masing-masing urutan DNA (Cavalli-Sforza, 1997).

File dari kesembilan sekuen yang telah diedit dalam aplikasi *BioEdit* dibuka dengan aplikasi MEGA6. Kemudian dilakukan analisis data filogenetik dengan menu *Phylogenetic Analysis* dan memilih *Construct/Test Maximum Likelihood Tree*. Yang dan Rannala, (2012) menjelaskan bahwa metode *Maximum Likelihood* merupakan metode statistik yang memiliki basis karakter dengan membandingkan seluruh sekuen dalam pensejajaran dalam memperhitungkan nilai kemungkinan pada setiap pohon. Metode ini mempertimbangkan semua kemungkinan jumlah

perubahan/mutasi pada sekuens untuk setiap pohon. Dharmayanti, (2011) menambahkan bahwa pada metode *Maximum Likelihood* (ML) dilakukan berupa metode *bootstrap* yang melakukan re-sampling berulang kali terhadap sekuens untuk melihat validitas susunan dari pohon filogenetik, dengan jumlah replikasi sebanyak 500x agar mempersingkat waktu konstruksi. Sedangkan pada penelitian ini digunakan *bootstrap* dengan jumlah replikasi 1000 kali.

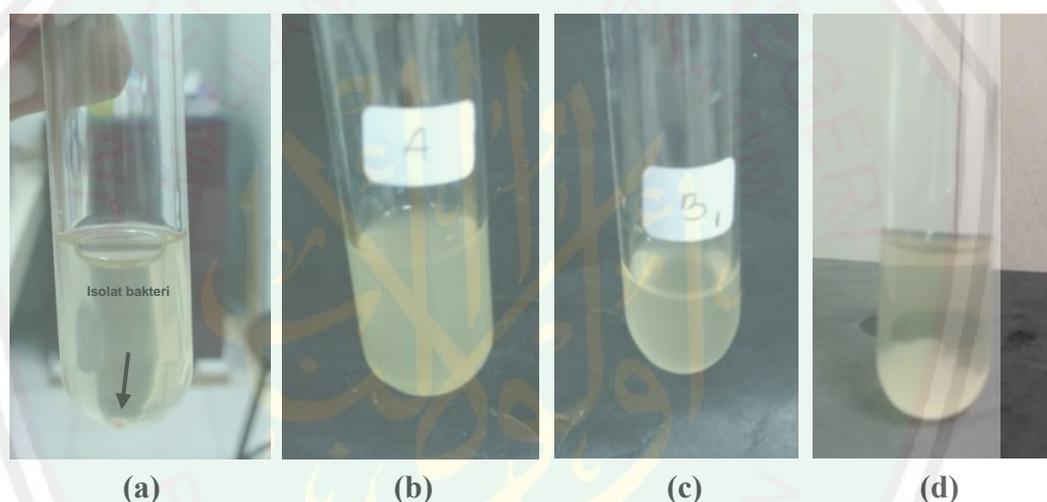
## **4.2 Karakteristik Pertumbuhan Bakteri Resisten Selenate yang Ditemukan pada Sedimen Mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo dalam Media yang mengandung Selenate**

### **4.2.1 Uji Kemampuan Resistensi Bakteri**

Isolat yang ditumbuhkan dalam media cair nantinya juga akan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm untuk diketahui kurva pertumbuhan isolat bakteri. Selain itu, menurut Khalilian, *et al.*, (2015) uji pada media cair ini dilakukan untuk memastikan perubahan warna merah yang terjadi pada media padat bukan terjadi akibat adanya pigmentasi pada koloni isolat bakteri. Ketiga isolat bakteri dikultur pada media cair dengan konsentrasi 10 mM yang kemudian ditumbuhkan dalam waktu 1x24 jam. Menurut Mas'ud (2013) tujuan dilakukannya peremajaan pada bakteri adalah untuk mendapatkan biakan yang baru dan muda, sehingga dapat berkembangbiak dengan baik dan dapat digunakan sesuai dengan fungsinya. Hal tersebut juga dijelaskan oleh Dwidjoseputro (1994) bahwa inkubasi bakteri dilakukan selama 24 jam karena pada waktu tersebut bakteri dimungkinkan telah berada pada *log-phase*. Pada fase tersebut bakteri melakukan pembelahan secara konstan dan jumlah sel meningkat. Menurut Pleczar dan Chan, (2008) waktu 24

jam merupakan waktu panen, dimana waktu tersebut telah berada pada fase logaritmik atau eksponensial yang jumlah selnya terbanyak yaitu mencapai 10 sampai 15 milyar sel bakteri per mililiter.

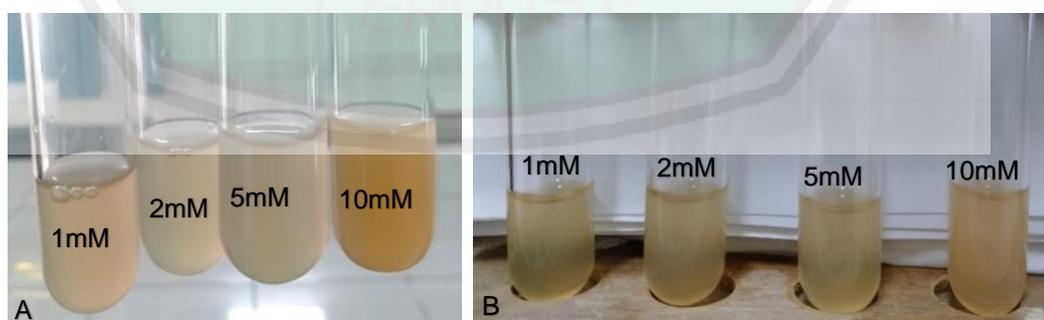
Hasil penumbuhan isolat bakteri pada media kultur selama 24 jam dapat dilihat pada gambar 4.6. Dari hasil tersebut didapatkan isolat A-5-1 dan isolat B-10-1 yang diremajakan pada media kultur menunjukkan perubahan warna lebih keruh dibandingkan dengan isolat B-10-2 yang menunjukkan adanya gumpalan dibagian bawah media cair.



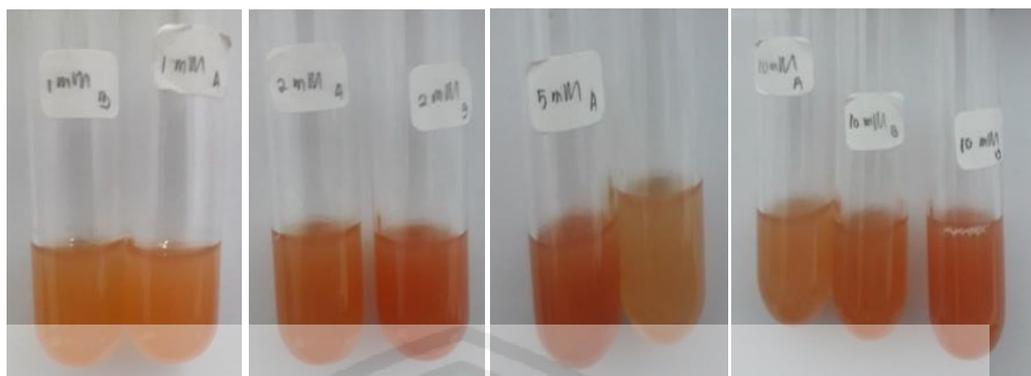
Gambar 4.6 Media YM cair; (a) Media 0 jam (b) isolat A-5-1 24 jam; (c) Isolat B-10-1 24 jam; (d) isolat B-10-2 24 jam

Isolat bakteri A-5-1 dan isolat B-10-1 dipilih karena dihasilkan bakteri yang tumbuh dengan ditandai adanya perubahan warna media cair. Kedua isolate kemudian diinokulasi pada media cair dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 1 mM, 2 mM, 5 mM, dan 10 mM. Hasil didapatkan pada media terjadi perubahan warna menjadi merah yang menandakan adanya reaksi bakteri terhadap media yang mengandung selenate. Pada gambar 4.7 dan gambar 4.8 menunjukkan

adanya perubahan warna merah di semua konsentrasi. Gambar 4.7 merupakan kondisi 2 jam pertama setelah pemberian 30 mikrolite bakteri dari media kultur. Media pada isolat A-5-1 dengan konsentrasi 10 mM terlihat warna yang lebih gelap daripada konsentrasi lainnya. Sedangkan pada konsentrasi yang sama media isolat B-10-1 tidak menunjukkan perubahan warna yang berbeda jauh dengan konsentrasi yang lain. Berdasarkan hasil tersebut menandai bahwa pada isolat A-5-1 memiliki respon akumulasi terhadap logam selenate sangat cepat dibandingkan dengan isolat B-10-1 pada 2 jam pertama setelah pemberian dari media kultur bakteri. Akan tetapi pada pengamatan berikutnya, warna media dengan isolat B-10-1 menunjukkan warna yang lebih merah. Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan waktu akumulasi bakteri terhadap logam selenate pada media. Media berwarna merah seiring pertambahan waktu pertumbuhan pada media tumbuh. Pada gambar 4.8 terjadi perubahan warna media menjadi merah. Khalilian, *et al.*, (2014) menjelaskan perubahan warna menjadi merah atau kuning kemerahan menandakan terjadi proses pengurangan kadar logam berat selenium toksik menjadi selenium elemental oleh bakteri.



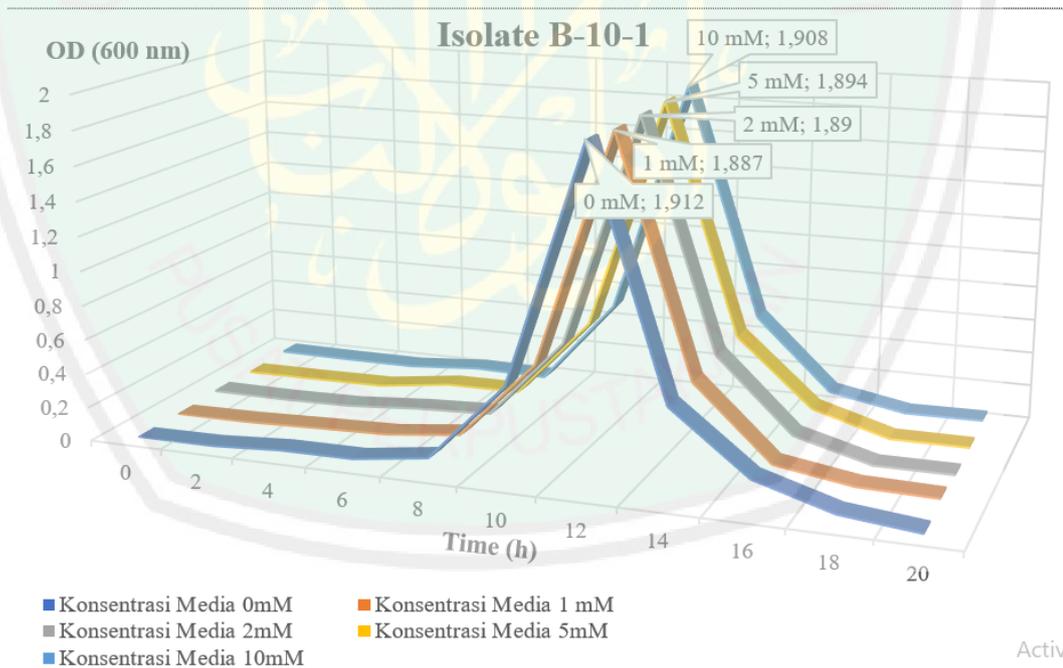
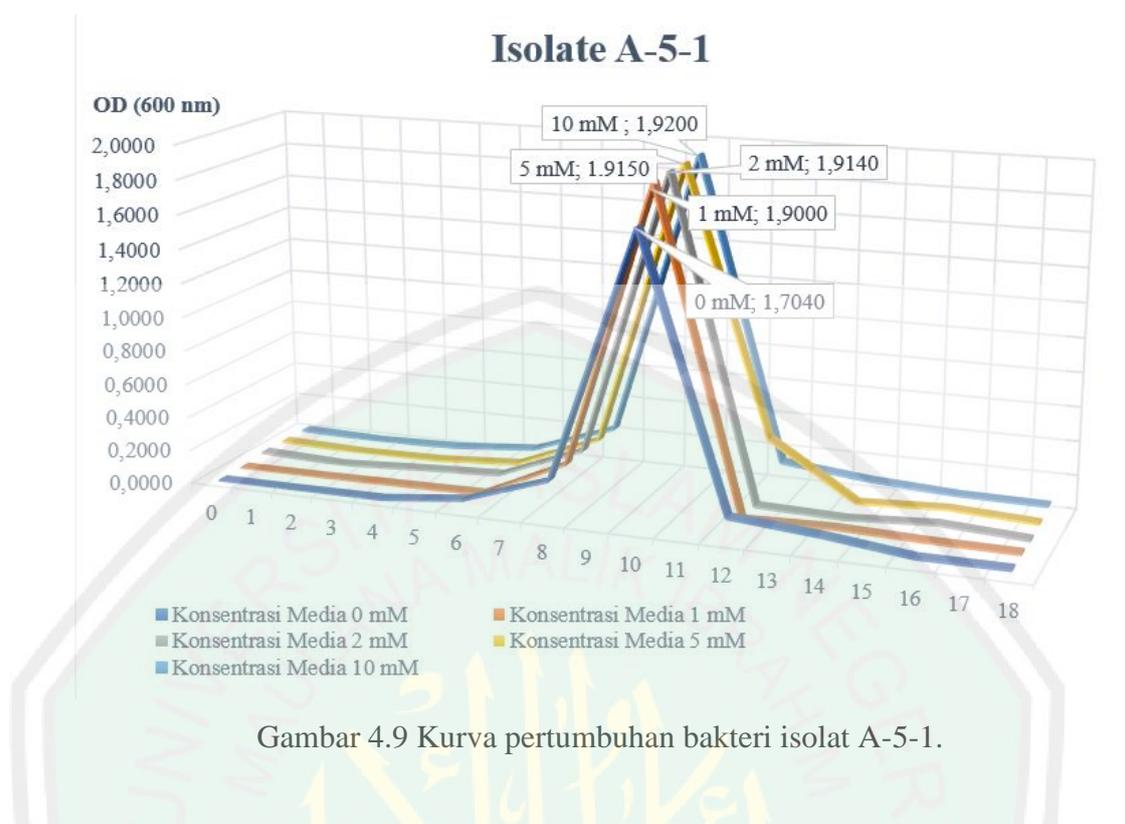
Gambar 4.7 Hasil Perubahan Warna Media 2 jam setelah pemberian bakteri kultur



Gambar 4.8 Hasil Perubahan Warna Media selama 26 jam

#### 4.2.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui waktu yang optimum bakteri dapat tumbuh secara meningkat. Menurut Purwoko (2007), pertumbuhan bakteri pada media tumbuh memiliki fase-fase yang menunjukkan aktifitasnya terhadap media tumbuh. Fase-fase tersebut meliputi fase adaptasi (*lag-phase*), fase perbanyakan atau peningkatan (*log-phase* atau *exponential-phase*), fase statis (*stasioner-phase*) dan terakhir adalah fase kematian (*death-phase*). Pengamatan kurva pertumbuhan bakteri pada media YMEB ini dilakukan selama 26 jam dengan interfal waktu selama 2 jam hingga didapatkan penurunan OD dari sampel. Pada pengamatan ini, digunakan panjang gelombang 600 nm dan media standar yang digunakan adalah media YMEB dengan konsentrasi yang berbeda. Sampel bakteri yang diambil sebanyak 50  $\mu$ l yang dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambah 650  $\mu$ l media standart. Isolat bakteri yang diukur kurva pertumbuhannya adalah dua isolat bakteri hasil pengamatan resistensi pada media cair menunjukkan perubahan warna keruh (lihat gambar 4.6). Hasil kurva pertumbuhan Isolat A-5-1 dan Isolat B-10-1 dapat dilihat pada gambar 4.9 dan 4.10.



Berdasarkan kurva pertumbuhan dari isolat A-5-1 (gambar 4.9), didapatkan *exponential-phase* atau fase peningkatan dimulai pada pengukuran ke 5 (8 jam)

dan ke 6 (10 jam) yang ditandai dengan meningkatnya angka absorbansi sampai pada titik maksimum. Sedangkan kurva isolat B-10-1 (gambar 4.10), pertumbuhan meningkat didapatkan pada pengukuran ke 6 (10 jam) sampai pada pengukuran ke 7 (12 jam). Pada penelitian ini didapatkan puncak peningkatan jumlah sel isolat A-5-1 pada konsentrasi yang berbeda memiliki waktu yang sama yaitu pada 8-10 jam setelah pemberian bakteri kultur. Hal tersebut juga terjadi pada media dengan isolat B-10-1 yang menunjukkan peningkatan jumlah sel bakteri di waktu yang bersamaan yaitu pada 10 – 12 jam setelah pemberian kultur. Pada kedua isolat, adanya pemberian selenate dalam media cair menyebabkan peningkatan jumlah sel bakteri seiring adanya peningkatan konsentrasi. Media dengan konsentrasi lebih tinggi memiliki nilai absorbansi yang lebih tinggi pula dibandingkan media dengan konsentrasi lebih rendah. Hal itu dimungkinkan karena adanya penambahan konsentrasi logam selenate menyebabkan peningkatan pertumbuhan jumlah sel bakteri dalam media. Selain itu, dimungkinkan bakteri yang diisolasi telah terpapar logam selenate (Se VI) secara langsung di lingkungan.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hindersah *et al.*, (2014) terhadap *Azotobacter*, didapatkan bahwa pertumbuhan bakteri terjadi peningkatan yang sejalan dengan peningkatan kadar timbal nitrat di dalam kultur sehingga resistensi mikroorganisme memberikan efek positif terhadap pertumbuhan bakteri. Selain itu, menurut Hindersah *et al.*, (2009) penambahan logam berat dalam media kultur memungkinkan dapat memberikan efek positif terhadap pertumbuhan bakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Zheng (2007) menunjukkan bahwa logam berat pada konsentrasi rendah memiliki efek stimulasi pada biomassa karbon mikroba tanah. Selain itu, menurut Wyszowska dan

Wyszkowski (2002), peningkatan jumlah mikroorganisme tertentu dalam kontaminasi logam berat pada jumlah yang relatif rendah disebabkan adanya nutrisi tersedia yang berasal dari degradasi sel-sel bakteri tidak toleran terhadap logam berat.

Fase pertama (*lag-phase*) dari kedua bakteri tidak didapatkan penambahan populasi. Menurut Pelczar (2008), pada fase pertama bakteri tidak mengalami penambahan populasi akan tetapi mengalami perubahan komposisi kimia, penambahan ukuran sel, dan mengalami penambahan sustansi dari intraselular. Purwoko (2017) mengatakan bahwa proses adaptasi pada bakteri terhadap media meliputi proses sintesis enzim baru yang sesuai dengan media yang diberikan serta pemulihan terhadap unsur metabolit yang bersifat toksik, misalnya alkohol, asam-asam, dan basa pada media asal (media lama). Bakteri akan melakukan pembelahan pada sel dalam media setelah didapatkan kondisi yang ideal dalam pertumbuhannya. Tahap tersebut nantinya masuk pada fase *log-phase* atau fase peningkatan.

Fase peningkatan atau *log-phase* terjadi di semua konsentrasi media perlakuan dengan waktu yang bersamaan. Hal ini terjadi dikarenakan bakteri yang disuspensikan terhadap media uji merupakan bakteri yang berasal dari media pertumbuhan kultur yang sama, yaitu berasal dari bakteri kultur pada media YMEB berumur 24 jam pada konsentrasi media cair 10 mM selenate. Hal tersebut yang diduga menyebabkan perubahan fase pertumbuhannya terjadi hampir bersamaan. Pada fase ini, bakteri mengalami peningkatan jumlah sel yang ditandai dengan nilai OD pada panjang gelombang 600 nm. Didapatkan pada Isolat A-5-1, pengukuran ke 5 (8 jam) adalah 0,246 pada 1 mM; 0,25 pada 2 mM; 0,24 pada 5

mM; dan 0,234 pada 10 mM. Sedangkan pada pengukuran ke 6 (10 jam) didapatkan puncak dari fase eksponensial dengan 1,900 pada 1 mM; 1,914 pada 2 mM, dan 1,915 pada 5 mM; serta 1,920 pada 10mM.

Pertumbuhan yang meningkat juga terdapat pada isolat B-10-1 dengan meningkatnya nilai OD pada pengamatan 6 (10 jam) dan 7 (12 jam). Pada pengamatan 10 jam, diperoleh nilai OD 0,540 pada 1 mM; 0,539 pada 2 mM; 0,538 pada 5 mM; dan 0,530 pada 10 mM. Sedangkan pada pengukuran ke 7 (12 jam) didapatkan puncak dari fase eksponensial dengan 1,887 pada 1 mM; 1,890 pada 2 mM, dan 1,894 pada 5 mM; serta 1,908 pada 10mM. Pelczar (2008) menjelaskan bahwa pada fase ini bakteri mengkonsumsi nutrisi pada media. Selain itu bakteri akan melakukan proses fisiologis sehingga terjadi peningkatan jumlah sampai pada tanda batas tertentu yang ditandai dengan penurunan nilai OD.

Nilai OD yang maksimum bisa disebut juga fase statis atau *stasioner phase* karena pada fase tersebut terjadi pemberhentian pembelahan sel bakteri sehingga nilai absorbansinya tidak bertambah. Dwidjoseputro (1994) menjelaskan bahwa akondisi statis terjadi ketika adanya penumpukan produk beracun yang didapatkan dari akumulasi metabolit toksik serta tidak tersedianya nutrisi untuk bertahan hidup. Selain itu juga tidak ada kadar oksigen yang mencukupi dalam media tumbuh suatu bakteri.

Penurunan nilai OD mengawali terjadinya fase kematian atau *death-phase*. Pelczar (2008) menjelaskan pada fase ini bakteri mengalami kematian yang cepat dibandingkan dengan terbentuknya sel baru. Purwoko (2007) menjelaskan bahwa adanya kematian sel bakteri adalah diakibatkan penurunan energi pada sel sehingga terjadi autolisis pada sel. Kemampuan bakteri untuk bertahan pada

kondisi tercekam berbeda-beda dan untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan dengan mengisolasi kembali bakteri ke dalam media yang baru.

#### 4.2 Dialog Hasil Penelitian dan Islam

Kaitannya membahas hasil penelitian ini dalam perspektif islam, terjadinya kerusakan berupa pencemaran dilokasi sekitar Pembangkit Listrik Tenaga Uap (PLTU) Paiton disebabkan oleh ulah perbuatan manusia, salah satunya adanya penambangan batu bara ditengah laut dan aktivitas pelayaran batu bara yang menyebabkan terbawanya residu logam-logam berat dan terakumulasi dalam perairan maupun pada sedimen pantai. Secara eksplisit Al-Quran menjelaskan dalam Surah Ar-Rum ayat 41. Dalam ayat tersebut, manusia sebagai ciptaan Allah lah yang harus bertanggung jawab sekaligus menanggung berbagai macam dampak buruk dari hal yang dilakukan di muka bumi. Allah SWT juga telah melarang manusia melakukan perbuatan yang dapat merusak kehidupan. Allah SWT berfirman dalam surat Al-A'raf ayat 56:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا ۚ إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

*Artinya: "Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik."*

Tafsir Ibnu Katsir menjelaskan bahwa Allah SWT melarang manusia melakukan perbuatan yang menimbulkan kerusakan di bumi dan juga hal-hal yang membahayakan kelestariannya sesudah diperbaiki. Dalam penelitian ini, kegiatan yang termasuk dalam aktivitas “menyebabkan kerusakan” adalah melakukan penambangan dengan tidak diimbangi kegiatan filtrasi logam-logam sisa

penambangan yang menyebabkan masih terbawanya logam-logam yang berbahaya terhadap lingkungan dan biota laut.

Segala sesuatunya telah berjalan sesuai dengan kelestariannya, dan apabila kemudian terjadilah pengerusakan padanya, akan membahayakan tidak hanya berdampak terhadap manusia saja, akan tetapi terhadap semua hamba Allah SWT termasuk mikroorganismenya. Sehingga Allah SWT memerintahkan kepada manusia agar menyembah-Nya dan berdoa kepada-Nya serta berendah diri dan memohon belas kasihan-Nya. Hal itu dijelaskan dalam akhir ayat-Nya yang artinya *“Dan berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan).”*

Kaitannya dengan adanya bakteri yang tumbuh pada kondisi tercemar serta sebagai pemulih lingkungan tercemar, pada penelitian ini diperoleh 2 isolat bakteri yaitu isolat A-5-1 dan isolat B-10-1 yang memiliki kemampuan resisten pada kondisi lingkungan tercemar selenate. Selain hal tersebut, isolat yang diperoleh juga diduga memiliki kemampuan dalam mereduksi atau mengurangi cemaran logam berat selenate (Se VI) menjadi selenium (Se 0) yang terdapat pada sedimen mangrove. Dalam hal ini, peran manusia sebagai khalifah sangat penting. Khalifah merupakan peran manusia yang telah ditetapkan Allah bukan hanya sekedar menjadi penguasa di bumi, tetapi juga sebagai pemakmur bumi. Khalifah memiliki makna menggantikan siapapun yang datang sebelumnya untuk menegakkan kehendak-Nya (Shihab, 2011). Khalifah ditugaskan mampu menyeimbangkan apa yang ada di bumi agar tidak terjadi kerusakan yang dapat mengakibatkan ketidakseimbangan sumber daya alam.

Allah SWT telah berfirman di dalam Al-Qur'an surah Al-Baqarah ayat 30 yang berbunyi:

وَإِذْ قَالَ رَبُّكَ لِلْمَلَائِكَةِ إِنِّي جَاعِلٌ فِي الْأَرْضِ خَلِيفَةً ۗ قَالُوا أَتَجْعَلُ فِيهَا مَنْ يُفْسِدُ فِيهَا وَيَسْفِكُ الدِّمَاءَ وَنَحْنُ نُسَبِّحُ بِحَمْدِكَ وَنُقَدِّسُ لَكَ ۗ قَالَ إِنِّي أَعْلَمُ مَا لَا تَعْلَمُونَ

*Artinya: "Ingatlah ketika Tuhanmu berfirman kepada para malaikat, "Sesungguhnya Aku hendak menjadikan seorang khalifah di muka bumi." Mereka berkata, "Mengapa Engkau hendak menjadikan (khalifah) di bumi itu orang yang akan membuat kerusakan padanya dan menumpahkan darah, padahal kami senantiasa bertasbih dengan memuji Engkau dan menyucikan Engkau!" Tuhan berfirman, "Sesungguhnya Aku mengetahui apa yang tidak kalian ketahui."*

Manusia diciptakan menjadi khalifah di muka bumi ini tidak untuk melakukan perusakan dan pertumpahan darah. Tetapi untuk membangun kehidupan yang damai, sejahtera, dan penuh keadilan. Menurut Ridwan (2005), perusak lingkungan dapat digolongkan dalam kafir ekologis (*kufr al-bi'ah*). Hal itu dikarenakan di antara tanda kebesaran Allah SWT adalah adanya bumi dan seisinya.

Melakukan perusak terhadap lingkungan sama halnya dengan ingkar (kafir) terhadap kebesaran Allah SWT. Sebagaimana dalam Qur'an surah Shad ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۗ ذَلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ

*Artinya: "Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka."*

Ayat ini menerangkan kepada kita bahwa memahami alam secara sia-sia merupakan pandangan orang-orang kafir, terlebih kepada mereka yang sampai melakukan perusakan. Ditemukannya isolat bakteri (Isolat A-5-1 dan isolat B-10-1) yang memiliki kemampuan resisten dan mengakumulasi logam berat selenate di lokasi pantai Banyuglugur ini menjadi salah satu bukti bahwa segala yang Allah SWT ciptakan, sekecil apapun itu memiliki kemanfaatan yang besar. Isolat bakteri yang diperoleh dapat dimanfaatkan oleh penduduk sekitar atau bahkan oleh perusahaan tambang untuk mencegah kerusakan alam berupa pencemaran pantai, terlebih pada logam selenate. Pemanfaatan bakteri yang dimaksudkan adalah pemanfaatan bioremediasi. Bioremediasi dapat dilakukan melalui lima pendekatan berikut: bioreaktor, perlakuan fase padat, pengomposan, *land-farming*, dan perlakuan *in situ*.

Banyak hal yang dapat manusia lakukan dalam kaitannya menjaga alam dalam kehidupan sehari-hari. Dalam pembahasan sederhananya, sikap maupun cara manusia sebagai khalifah dalam menjaga alam memiliki banyak ruang lingkup keilmuan, antara lain dalam ruang lingkup ilmu sosial, ruang lingkup ilmu alam (*sains*), dan juga ruang lingkup ilmu hukum. Ruang lingkup ilmu sosial meliputi kegiatan manusia yang berupa *hablum minan naas wa hablum minal 'alam*. Maksudnya adalah kegiatan manusia yang melibatkan kegiatan sosial dalam menjaga hubungannya dengan alam. Sebagai salah satu contoh adalah dengan menjadi seorang aktifis lingkungan ataupun dengan melakukan kegiatan-kegiatan sosial yang berdampak pada lingkungan kearah yang lebih baik. Ruang lingkup ilmu hukum dapat berupa membuat suatu regulasi atau peraturan pengelolaan sumber daya alam sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan di

alam. Sementara, dalam ruang lingkup ilmu alam atau juga disebut ruang lingkup *sains*, kegiatan manusia menjaga lingkungan lebih ditekankan kepada bagaimana manusia mengkaji kejadian-kejadian dari tanda kekuasaanNya dan merumuskannya dalam suatu penelitian guna menggali hikmah dari tanda-tanda kekuasaan-Nya di alam semesta, salah satunya adalah penelitian mencari sumber alternatif dalam upaya mencegah dan mengurangi tingkat pencemaran logam berat terhadap lingkungan.

Allah SWT dalam surah Al-Maidah ayat 32:

مَنْ أَجَلِ ذَلِكَ كَتَبْنَا عَلَىٰ بَنِي إِسْرَائِيلَ أَنَّهُ مَنْ قَتَلَ نَفْسًا بِغَيْرِ نَفْسٍ أَوْ فَسَادٍ فِي الْأَرْضِ فَكَأَنَّمَا قَتَلَ النَّاسَ جَمِيعًا وَمَنْ أَحْيَاهَا فَكَأَنَّمَا أَحْيَا النَّاسَ جَمِيعًا وَلَقَدْ جَاءَتْهُمْ رُسُلُنَا بِالْبَيِّنَاتِ ثُمَّ إِنَّ كَثِيرًا مِنْهُمْ بَعَدَ ذَلِكَ فِي الْأَرْضِ لَمُسْرِفُونَ

*Artinya: "Oleh karena itu Kami tetapkan (suatu hukum) bagi Bani Israel, bahwa: barang siapa yang membunuh seorang manusia, bukan karena orang itu (membunuh) orang lain, atau bukan karena membuat kerusakan di muka bumi, maka seakan-akan dia telah membunuh manusia seluruhnya. Dan barang siapa yang memelihara kehidupan seorang manusia, maka seolah-olah dia telah memelihara kehidupan manusia semuanya. Dan sesungguhnya telah datang kepada mereka rasul-rasul Kami dengan (membawa) keterangan-keterangan yang jelas, kemudian banyak di antara mereka sesudah itu sungguh-sungguh melampaui batas dalam berbuat kerusakan di muka bumi."*

Sehingga diharapkan dengan melakukan perilaku atau perbuatan menjaga lingkungan dengan beberapa ruang lingkup keilmuan, manusia dapat meningkatkan keimanan seseorang kepada sang Maha Pencipta alam semesta. Selain itu, dengan adanya perilaku menjaga lingkungan, diharapkan manusia mampu memperbaiki diri untuk tidak melakukan hal-hal yang bertentangan dan

dilarang oleh agama dalam kaitannya mengelola dan memanfaatkan alam semesta beserta seisinya.



## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian yang dilakukan, diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil dari isolasi bakteri resisten selenate pada sedimen mangrove Pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo didapatkan 2 isolat bakteri, yaitu isolat A-5-1 dan B-10-1 yang ditunjukkan dengan koloni berwarna merah. Hasil uji molekuler didapatkan Isolat A-5-1 memiliki persentase kemiripan 98,83% dengan spesies *Bacillus cucumis* strain PK15, *Bacillus fumarioli* strain PF1, dan *Bacillus aestuarii* strain IAE10. Isolat B-10-1 memiliki persentase kemiripan 89,86% dengan spesies *Klebsiella oxytoca* strain Rizhao 567.2; *Klebsiella oxytoca* strain Rizhao 615.1; dan *Klebsiella oxytoca* strain Rizhao 615.1.
2. Karakteristik isolat bakteri A-5-1 dan isolat B-10-1 menunjukkan perubahan warna pada media cair diberbagai konsentrasi. Peningkatan pertumbuhan isolat bakteri A-5-1 dua jam lebih cepat dari pada isolat bakteri B-10-1.

### 5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan uji akumulasi terhadap logam selenate pada sedimen mangrove serta melakukan perbandingan terhadap kemampuan tanaman mangrove sebagai tanaman remediator.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Albani, M.S. (2006). *Shahih Sunan Tirmidzi* (Seleksi Hadits Shahih Dari Kitab Sunan Tirmidzi Buku: 2). Jakarta: Pustaka Azzam.
- Alongi, D. M. (2002). Present state and future of the world's mangrove forests. *Environmental conservation*, 29(3), 331-349.
- Amalia, W. (2017). *Bioakumulasi selenium oleh bakteri resisten selenium yang diisolasi dari Pantai Utara Desa Campurejo Kecamatan Panceng Gresik* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Andren, A. W., Klein, D. H., & Talmi, Y. (1975). Selenium in coal-fired steam plant emissions. *Environmental Science & Technology*, 9(9), 856-858.
- Avendaño, R., Chaves, N., Fuentes, P., Sánchez, E., Jiménez, J. I., & Chavarría, M. (2016). Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440. *Scientific reports*, 6, 37155.
- Bailey, R. L., Gahche, J. J., Lentino, C. V., Dwyer, J. T., Engel, J. S., Thomas, P. R., ... & Picciano, M. F. (2010). Dietary supplement use in the United States, 2003–2006. *The Journal of nutrition*, 141(2), 261-266.
- Baird, R. B., Pourian, S., & Gabrielian, S. M. (1972). Determination of trace amounts of selenium in wastewaters by carbon rod atomization. *Analytical chemistry*, 44(11), 1887-1889.
- Bandaranayake, W. M. (1998). Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and salt marshes*, 2(3), 133-148.
- Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Selenium. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 265-278.
- Budiyanto, F. (2014). Distribution of Metals in Cisanggarung Estuary Sediment, West Java, Indonesia. *Marine Research in Indonesia*, 39(1), 23-30.
- Combs Jr, G. F., & Gray, W. P. (1998). Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacology & therapeutics*, 79(3), 179-192.
- Cutter, G. A. (1989). The estuarine behaviour of selenium in San Francisco Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 28(1), 13-34.
- Debieux, C. M., Dridge, E. J., Mueller, C. M., Splatt, P., Paszkiewicz, K., Knight, I., ... & Richardson, D. J. (2011). A bacterial process for selenium nanosphere assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13480-13485.

- Devi, P., Jain, R., Thakur, A., Kumar, M., Labhsetwar, N. K., Nayak, M., & Kumar, P. (2017). A systematic review and meta-analysis of voltammetric and optical techniques for inorganic selenium determination in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 95, 69-85.
- Dias, A. C., Andreote, F. D., Rigonato, J., Fiore, M. F., Melo, I. S., & Araújo, W. L. (2010). The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(4), 541-551.
- Dilaga, S. H. (1992). Nutrisi Mineral pada Ternak-Kajian Khusus Unsur Selenium. *Akademia Presindo*. Jakarta.
- Doran, J. W. (1982). Microorganisms and the biological cycling of selenium. In *Advances in microbial ecology* (pp. 1-32). Springer, Boston, MA.
- Dreher, G. B., & Finkelman, R. B. (1992). Selenium mobilization in a surface coal mine, Powder River Basin, Wyoming, USA. *Environmental Geology and Water Sciences*, 19(3), 155-167.
- Dridge, E. J., Watts, C. A., Jepson, B. J., Line, K., Santini, J. M., Richardson, D. J., & Butler, C. S. (2007). Investigation of the redox centres of periplasmic selenate reductase from *Thauera selenatis* by EPR spectroscopy. *Biochemical Journal*, 408(1), 19-28.
- Dumont, E. (2006). *Hyphenated techniques for speciation of Se in biological matrices* (Doctoral dissertation, Ghent University).
- Dwijoseputro. 1994. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. Djembata: Jakarta.
- Ekawati, Evy Ratnasari, Ni'matuzahroh, Tini Surtiningsih, dan Agus Supriyanto. 2012. Eksplorasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik pada Limbah Daduk Tebu (*Saccharum officinarum* L). *Berk Penel Hayati*. Vol. 18: 31–34.
- EPA. 1979. Water-related Environmental Fate of 129 Priority Pollutants. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Planning and Standards. EPA 440/4-29-029.
- Eswyah, A. S. (2018). *Bioremediation of selenium species in solution by methanotrophic bacteria* (Doctoral dissertation, Sheffield Hallam University).
- Ferreira Filho, A. S., Quecine, M. C., Bogas, A. C., de Barros Rossetto, P., de Souza Lima, A. O., Lacava, P. T., ... & Araújo, W. L. (2012). Endophytic *Methylobacterium extorquens* expresses a heterologous  $\beta$ -1, 4-endoglucanase A (EglA) in *Catharanthus roseus* seedlings, a model host plant for *Xylella fastidiosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1475-1481.

- Ganther, H. E. (1968). Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry*, 7(8), 2898-2905.
- Gebreyessus, G. D., & Zewge, F. (2019). A review on environmental selenium issues. *SN Applied Sciences*, 1(1), 55.
- Goldhaber, S. B. (2003). Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 38(2), 232-242.
- Grützmacher, G., Kumar, P. S., Rustler, M., Hannappel, S., & Sauer, U. (2013). Geogenic groundwater contamination—definition, occurrence and relevance for drinking water production. *Zbl Geol Paläont Teil I*, 1, 69-75.
- Gupta, M., & Gupta, S. (2017). An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2074.
- Haygarth, P. M. (1994). Global importance and global cycling of selenium. *Selenium in the Environment*, 1-27.
- He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 19(2-3), 125-140.
- Herawati, N., Suzuki, S., Hayashi, K., Rivai, I. F., & Koyama, H. (2000). Cadmium, copper, and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia, and China by soil type. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64(1), 33-39.
- Hindersah, R., Arief, D. H., Soemitro, S., & Gunarto, L. (2009). Pengaruh CdCl<sub>2</sub> terhadap Produksi Eksopolisakarida dan Daya Hidup Azotobacter. *Jurnal Natur Indonesia*, 12(01), 34-37.
- Hindersah, R., & Kamaluddin, N. N. (2014). Pengaruh Timbal terhadap Kepadatan Sel dan kadar Eksopolisakarida Kultur Cair Azotobacter. *Bionatura*, 16(1).
- Ike, M., Takahashi, K., Fujita, T., Kashiwa, M., & Fujita, M. (2000). Selenate reduction by bacteria isolated from aquatic environment free from selenium contamination. *Water Research*, 34(11), 3019-3025.
- Javed, S., Sarwar, A., Tassawar, M., & Faisal, M. (2015). Conversion of selenite to elemental selenium by indigenous bacteria isolated from polluted areas. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 27(4), 162-168.
- Jhonson, J. L. (1984). Nucleic Acid in Bacterial Classification. *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology*. Vol. 1, 8-11.

- Johansson, L., Gafvelin, G., & Arnér, E. S. (2005). Selenocysteine in proteins—properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1726(1), 1-13.
- Kathiresan, K., & Selvam, M. M. (2006). Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil. *Botanica Marina*, 49(1), 86-88.
- Khalilian, M., Zolfaghari, M. R., & Soleimani, M. (2015). High potential application in bioremediation of selenate by *Proteus hauseri* strain QW4. *Iranian journal of microbiology*, 7(2), 94.
- Khalilian, M., Zolfaghari, M. R., Soleimani, M., & Zand Monfared, M. R. (2014). *Bacillus* sp. strain QW90, a bacterial strain with a high potential application in bioremediation of selenite. *Report of Health Care*, 1(1), 7-11.
- Klonowska, A., Heulin, T., & Vermeglio, A. (2005). Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(9), 5607-5609.
- Kozdroj, J., & van Elsas, J. D. (2001). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 43(3), 197-212.
- Kwaśna, H., Bateman, G. L., & Ward, E. (2008). Determining species diversity of microfungus communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 44-56.
- Lemly, A. D. (2004). Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(1), 44-56.
- Lemly, A. D. (1985). Toxicology of selenium in a freshwater reservoir: Implications for environmental hazard evaluation and safety. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 10(3), 314-338.
- Lemly, A. D. (1997). Environmental hazard of selenium in the Animas La Plata water development project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37(1), 92-96.
- Liu, Y. T., Chen, T. Y., Mackeebe, W. G., Ruhl, L., Vengosh, A., & Hsu-Kim, H. (2013). Selenium speciation in coal ash spilled at the Tennessee Valley Authority Kingston site. *Environmental science & technology*, 47(24), 14001-14009.
- Luoma, S. N., & Rainbow, P. S. (2008). *Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management*. Cambridge university press.
- Macy, J. M., Rech, S., Auling, G., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Sly, L. I. (1993). *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass

- of Proteobacteria with a novel type of anaerobic respiration. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(1), 135-142.
- Maier KJ, Foe C, Ogle RS, *et al.*, 1988. The Dynamics of Selenium in Aquatic Ecosystems. In: Hemphill dd, Ed. Trace Substances in Environmental Health. *XXI Proceedings*. Columbia, MO: University of Missouri, 361-408.
- Madani, M. (1997). Memahami Musibah dan Amanah: Kajian atas Surah alAnfal. *dalam Moh. Mahfud MD dkk. (Ed.). Spiritualitas Alquran dalam Membangun Kearifan Umat*. Yogyakarta: LPPAI UII.
- Masindi, Vhahangwele dan Khathutshelo L. Muedi. 2018. Environmental Contamination by Heavy Metals. *IntechOpen*. Chapter 7
- Mertz, W. (1981). The essential trace elements. *Science*, 213(4514), 1332-1338.
- Mishra, R. R., Prajapati, S., Das, J., Dangar, T. K., Das, N., & Thatoi, H. (2011). Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product. *Chemosphere*, 84(9), 1231-1237.
- Nancharaiah, Y. V., & Lens, P. N. L. (2015). Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 79(1), 61-80.
- NAS. 1976a. Selenium. *Comm Med Biol Effects Environ Pollut Subcomm - Selenium*. Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Nasrazadani, A., Tahmourespour, A., & Hoodaji, M. (2011). Determination of bacteria resistance threshold to lead, zinc and cadmium in three industrial wastewater samples.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press.
- Nies, D. H. (2000). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 451-460.
- Notodarmojo, S. 2005. *Pencemaran Tanah dan Air Tanah*. Bandung: ITB Press.
- Nuttall, K. L. (2006). Evaluating selenium poisoning. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 36(4), 409-420.
- Pelczar., Michael, J., and Chan, E. C. S. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid I*. Jakarta: UI Press.
- Priadie, Bambang. 2012. Teknik Bioremediasi sebagai Alternatif dalam Upaya Pengendalian Pencemaran Air. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. Volume 10, Issue 1: 38-48.

- Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. (2008). Dasar-Dasar Mikrobiologi Dasar Jilid 1.
- Priadie, B. (2012). Teknik bioremediasi sebagai alternatif dalam upaya pengendalian pencemaran air. *Jurnal ilmu lingkungan*, 10(1), 38-48.
- Puchkov, E. 2016. Image Analysis in Microbiology: A Review. *Journal of Computer and Communications*, 4, 8 -32.
- Quecine, M. C., Lacava, P. T., Magro, S. R., Parra, J. R. P., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2011). Partial characterization of chitinolytic extract from endophytic *Streptomyces* sp. and its effects on the boll weevil. *Nong Ye Ke Xue Yu Ji Shu*, 5(4).
- Ravikumar, S., Ramanathan, G., Suba, N., & Jeyaseeli, L. (2002). Quantification of halophilic *Azospirillum* from mangroves.
- Risher, John, A. Rosa McDonald, Mario J. Citra, Stephen Bosch, B.S. dan Richard J. Amata, M.S. 2001. *A Toxicological Profile for Selenium*. Georgia: Division of Toxicology.
- Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M., & Coves, J. (2001). Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(2), 769-773.
- Salomons, W., Förstner, U., & Mader, P. (Eds.). (2012). *Heavy metals: problems and solutions*. Springer Science & Business Media.
- Schubert, A., Holden, J. M., & Wolf, W. R. (1987). Selenium content of a core group of foods based on a critical evaluation of published analytical data. *Journal of the American Dietetic Association*, 87(3), 285-299.
- Secor, C. L., & Lisk, D. J. (1989). Variation in the selenium content of individual Brazil nuts. *Journal of food safety*, 9(4), 279-281.
- Sen, N., & Naskar, K. (2003). *Algal flora of Sundarbans mangals*. Daya Books.
- Shihab, M. Q. (2002). Tafsir al-misbah. *Jakarta: Lentera Hati*, 2.
- Simões, M. F., Antunes, A., Ottoni, C. A., Amini, M. S., Alam, I., Alzubaidy, H., ... & Bajic, V. B. (2015). Soil and rhizosphere associated fungi in gray mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea—a metagenomic approach. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(5), 310-320.
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of microbiological methods*, 95(3), 327-335.

- Spain, A., & Alm, E. (2003). Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment.
- Srinivas. T. (2008). *Environmental Biotechnology*. New Delhi: New Age International Publishers.
- Stadtman, T. C. (1990). Selenium biochemistry. *Annual review of biochemistry*, 59(1), 111-127.
- Staicu, L. C., Morin-Crini, N., & Crini, G. (2017). Desulfurization: Critical step towards enhanced selenium removal from industrial effluents. *Chemosphere*, 172, 111-119.
- Shils, M. E., & Shike, M. (Eds.). (2006). *Modern nutrition in health and disease*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Sunde, R. A. (2006). Selenium. Present Knowledge in Nutrition, Bowman BA, Russell RM eds.
- Tomei, F. A., Barton, L. L., Lemanski, C. L., Zocco, T. G., Fink, N. H., & Sillerud, L. O. (1995). Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(3-4), 329-336.
- Triana, E., Nurhidayat, N., Yulinery, T., Kasim, E., & Dewi, R. M. (2010). IDENTIFIKASI GEN SELENOMETIL TRANSFERASE (smt) PADA ISOLAT *Geobacillus* sp. 20K YANG RESISTEN TERHADAP SELENIUM. *Berita Biologi*, 10(3), 323-328.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. What We Eat in America external link disclaimer, 2009-2010
- Vinceti, M., Mandrioli, J., Borella, P., Michalke, B., Tsatsakis, A., & Finkelstein, Y. (2014). Selenium neurotoxicity in humans: bridging laboratory and epidemiologic studies. *Toxicology letters*, 230(2), 295-303.
- Waluyo, L. (2005). *Mikrobiologi Lingkungan*. Malang.
- WHO. 1971. International Standards for Drinking-water, Third Edition.
- Wyszkowska, J., & Wyszkowski, M. (2002). Effect of cadmium and magnesium on microbiological activity in soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 11(5), 585-592.
- Yazid, M. (2007). Kajian Pemanfaatan Bakteri hasil Isolasi sebagai Agen Bioremediasi Radionuklida Uranium di Lingkungan. *Jurnal Prosiding PPI*.

Sumiwi, S. A. (2018). SELENIUM DAN MANFAATNYA UNTUK KESEHATAN: REVIEW JURNAL. *Farmaka*, 16(2).

Zeng, L. S., Liao, M., Chen, C. L., & Huang, C. Y. (2007). Effects of lead contamination on soil enzymatic activities, microbial biomass, and rice physiological indices in soil-lead-rice (*Oryza sativa* L.) system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), 67-74.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Pembuatan Sediaan Larutan Natrium Selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ )

#### 1. Pembuatan larutan Stok 100mM

Masa molar Natrium Selenate = 188,85 gr/mol

1 Molar = 1000 mM

1000 mM = 188,85 gr/L

$$100 \text{ mM} = \frac{188,95 \text{ gram}}{10}$$

= 18,9 gr/L

$$\begin{aligned} \text{Membuat Stok 100 mM dalam 100 ml} &= \frac{18,9 \text{ gram}}{10} \\ &= 1,89 \text{ gram} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 100 ml larutan sodium selenate dengan konsentrasi 100 mM dengan cara melarutkan 1,89 gr serbuk  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  dengan aquaes 100 ml dan dihomogenkan.

#### 2. Pembuatan Larutan untuk Perlakuan

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi sodium selenate yang berbeda pada media YMEA dan YMEB, yaitu 0mM, 1mM, 2mM, 5mM, dan 10mM. Untuk membuat konsentrasi tersebut, dilakukan dengan menggunakan rumus pengenceran yaitu:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan:

M1: Masa/konsentrasi dari larutan stok sodium selenate

V1: Volume larutan stok sodium selenate yang diambil

M2: Masa/konsentrasi untuk larutan media yang dibutuhkan

V2: Volume total media yang akan diberi sodium selenate

Pembuatan media 1mM selenate dalam 15 ml media agar YMEA

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ mM} \times V1 = 1\text{mM} \times 15 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{15}{100}$$

$$V1 = 0,15 \text{ ml atau } 150 \mu\text{l}$$

Jadi, untuk membuat media agar YMEA dengan konsentrasi 1mM sebanyak 15 ml, diambil 150  $\mu\text{l}$  sodium selenate dari stok 100 mM kemudian ditambahkan 14,85 ml media agar YMEA ke dalam cawan petri.

| Konsentrasi | Sodium Selenate | Media YMEA/YMEB | Volume Total |
|-------------|-----------------|-----------------|--------------|
| 0 mM        | 0 ml            | 15 ml           | 15 ml        |
| 1 mM        | 0,15 ml         | 14,85 ml        | 15 ml        |
| 2 mM        | 0,3 ml          | 14,7 ml         | 15 ml        |
| 5 mM        | 0,75 ml         | 14,25 ml        | 15 ml        |
| 10 mM       | 1,5 ml          | 13,5 ml         | 15 ml        |

## Lampiran 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer Panjang gelombang 600 setiap 2 jam sekali sampai ditemukan penurunan absorbansi pada sampel.

### 1. Hasil Absorbansi pada isolat A-5-1

| Waktu | Konsentrasi Media |       |       |       |       |
|-------|-------------------|-------|-------|-------|-------|
|       | 0 mM              | 1 mM  | 2 mM  | 5 mM  | 10 mM |
| 0     | 0,002             | 0,003 | 0,021 | 0,016 | 0,014 |
| 2     | 0,002             | 0,004 | 0,002 | 0,001 | 0,001 |
| 4     | 0,005             | 0,009 | 0,029 | 0,008 | 0,013 |
| 6     | 0,059             | 0,015 | 0,051 | 0,04  | 0,055 |
| 8     | 0,228             | 0,246 | 0,250 | 0,241 | 0,234 |
| 10    | 1,704             | 1,906 | 1,910 | 1,910 | 1,899 |
| 12    | 0,135             | 0,039 | 0,036 | 0,355 | 0,139 |
| 14    | 0,093             | 0,053 | 0,022 | 0,034 | 0,087 |
| 16    | 0,034             | 0,038 | 0,052 | 0,058 | 0,058 |
| 18    | 0,033             | 0,033 | 0,022 | 0,032 | 0,052 |

### 2. Hasil Absorbansi pada isolat B-10-1

| Waktu | Konsentrasi Media |       |       |       |       |
|-------|-------------------|-------|-------|-------|-------|
|       | 0mM               | 1 mM  | 2mM   | 5mM   | 10mM  |
| 0     | 0,001             | 0,002 | 0,014 | 0,007 | 0,016 |
| 2     | 0,005             | 0,007 | 0,011 | 0,008 | 0,011 |
| 4     | 0,031             | 0,021 | 0,018 | 0,012 | 0,01  |
| 6     | 0,033             | 0,033 | 0,05  | 0,067 | 0,042 |
| 8     | 0,092             | 0,082 | 0,069 | 0,069 | 0,032 |
| 10    | 0,549             | 0,54  | 0,539 | 0,538 | 0,53  |
| 12    | 1,912             | 1,912 | 1,898 | 1,884 | 1,906 |
| 14    | 0,537             | 0,537 | 0,563 | 0,549 | 0,546 |
| 16    | 0,193             | 0,123 | 0,142 | 0,161 | 0,129 |
| 18    | 0,059             | 0,053 | 0,022 | 0,032 | 0,047 |
| 20    | 0,013             | 0,043 | 0,022 | 0,032 | 0,052 |

*Lampiran 3. Urutan Basa Nukleotida*

1. Isolat A-5-1

>A-16S\_F

CATGGACTTCAATGGACGAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCG  
 ATGAAGGCCGTTTCGGGTCGTGAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA  
 GTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC  
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC  
 GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGGTCCTTTAAG  
 TCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACT  
 GGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGG  
 TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGGCTTT  
 CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
 GATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  
 TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC  
 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
 GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGGTTTTTAATTTTCGAA

2. Isolat B-10-1

>B-16S\_F

TCAGTGGCATTGCCATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTA  
 TGAAGAAGGTCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGC  
 GATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCAC  
 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG  
 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCCGGTCTGTCAAGT  
 CGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGAAGCTGCTTGGAACCGGG  
 GGAGTTGGAGGCTTGAGAAGATGGCGGAATTCCCCGTGGAACCGTGA  
 AATGCCTAAAGATGTGGACGAACACCAGTGGCGAAGGCCGGCTTTCTG  
 GTCTGTTTTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACATGATTA  
 GATAACCCTGGAAGTCCACGCCGTACACCATGATGGCTAAGTGTAGAA  
 GGTTTCCGCCCTTTAATGCTGCTCCTTACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
 GGAGTTCGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  
 CACAAGCGGTGGAGCATGGTT

Lampiran 4. Hasil Sequencing Isolat

The image displays two screenshots of the Sequence Scanner software interface, showing sequencing results for two files: A-165\_Fab1 and B-165\_Fab1.

**Top Screenshot (A-165\_Fab1):**

| Trace File Name | Basecaller | Mobility File         | Base Spacing | Peak 1 Scan# | Basecall Start Scan# | Basecall Stop Scan# | Basecall Date/Time         |
|-----------------|------------|-----------------------|--------------|--------------|----------------------|---------------------|----------------------------|
| A-165_Fab1      | KB.bcp     | KB_3730_POP7_BDI3.mob | 14.48        | 1861         | 1862                 | 10167               | 2019-11-30 04:49:50 +09:00 |
| B-165_Fab1      | KB.bcp     | KB_3730_POP7_BDI3.mob | 14.47        | 1852         | 1853                 | 9981                | 2019-12-02 13:19:28 +09:00 |

The sequence view for A-165\_Fab1 shows the following sequence (positions 120-606):

```

1  CATGGGCTTC  AATGCAACGA  GCTGATGTA  GCACCCCGG  GTGGGCGAT  AAGGCGTTC  GGTCTGTGA  AGCTCTGTT  TTGGGGAAC  ACAAGTAGC  GAGTAACTG  GGTACCTTC  120
121  AGGTACTCTA  ACCAGAAAG  CACCGGTAA  TADGTGCCA  CAGCGCGGT  AATAGTAGG  TTGCAGGCT  TSTCCGGAT  FAITGGGGT  AAAGCGGCG  CAGCGGGTC  TTTAAGTCT  240
241  ATGTGAAGG  CCACGGCTC  ACGTGGAGG  GTCAITGGA  ACTGGGGAC  TTGAGTGCA  AAGAGGAAG  CGGAATCCA  GGTGTAGCG  TGAATGGGT  AGAGATGGG  AGGACACC  360
361  TTGGCGAAG  CAGCTTCTG  GCTGTAACT  GACGCTGAG  GCGGAAGCG  TGGGAGCAA  ACAGGATAG  ATACCTTGT  AGTCCAGCC  GTAAACGAT  AGTCTAAGT  GTAGAGGG  480
481  TTCCGCCCT  TATGCTGCA  GCTAACGCA  TAAGCACTG  GCTGGGGAG  TACGGCGCA  AGCTGAAAC  TCAAGGAAT  TGACGGGGG  CGGCACAGC  GGTGGAGCA  GCTTTTAA  600
601  TCGGA
    
```

**Bottom Screenshot (B-165\_Fab1):**

| Trace File Name | Basecaller | Mobility File         | Base Spacing | Peak 1 Scan# | Basecall Start Scan# | Basecall Stop Scan# | Basecall Date/Time         |
|-----------------|------------|-----------------------|--------------|--------------|----------------------|---------------------|----------------------------|
| A-165_Fab1      | KB.bcp     | KB_3730_POP7_BDI3.mob | 14.48        | 1861         | 1862                 | 10167               | 2019-11-30 04:49:50 +09:00 |
| B-165_Fab1      | KB.bcp     | KB_3730_POP7_BDI3.mob | 14.47        | 1852         | 1853                 | 9981                | 2019-12-02 13:19:28 +09:00 |

The sequence view for B-165\_Fab1 shows the following sequence (positions 120-593):

```

1  TCAGGGGCA  TGCACAGGG  GACGCTGAT  GCAGCATGG  GCGGTGTAT  AAGAGGCTC  TCGGCTTGA  AGTACTTTC  ASCGGGGAG  AAGGOGATA  GGTAAATAG  CTTGTCGAT  120
121  SAGGTACCC  SCAGAAAGG  CACCGGTAA  CTCCTGCCA  CAGCGCGGT  AATACGGAG  GGTGCAAGC  TTAATGGAA  TTACTGGCG  TAAAGGCGC  GAGGGGGTC  TGTCAGTCT  240
241  AATGTGAAG  CCACGGCTC  ACGTGGAGG  GTCAITGGA  ACTGGGGAC  TTGAGTGCA  AAGAGGAAG  CGGAATCCA  GGTGTAGCG  TGAATGGGT  AGAGATGGG  AGGACACC  360
361  TTGGCGAAG  CAGCTTCTG  GCTGTAACT  GACGCTGAG  GCGGAAGCG  TGGGAGCAA  ACAGGATAG  ATACCTTGT  AGTCCAGCC  GTAAACGAT  AGTCTAAGT  GTAGAGGG  480
481  TTCCGCCCT  TATGCTGCA  GCTAACGCA  TAAGCACTG  GCTGGGGAG  TACGGCGCA  AGCTGAAAC  TCAAGGAAT  TGACGGGGG  CGGCACAGC  GGTGGAGCA  GCTTTTAA  593
    
```

U.S. National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

BLAST+ » blastn suite » results for RID-Y9G6A38D016

Job Title: A-165\_F  
RID: Y9G6A38D016  
Program: BLASTN  
Database: nt  
Query ID: KJ1Query\_38965  
Description: A-165\_F  
Molecule type: dna  
Query Length: 606

Sequences producing significant alignments

| Description   | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession  |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| <a href="#">Bacillus pumilus strain PK15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG13925.1  |
| <a href="#">Bacillus furiosus strain PF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG09907.1  |
| <a href="#">Bacterium strain B0240 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>       | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG024128.1 |
| <a href="#">Bacterium strain B0268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>       | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG024129.1 |
| <a href="#">Bacterium strain B0303 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>       | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG024130.1 |
| <a href="#">Bacterium strain B0373 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>       | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG024131.1 |
| <a href="#">Bacterium strain B0424 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>       | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG024132.1 |
| <a href="#">Bacterium strain B0502 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>       | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG024133.1 |
| <a href="#">Bacterium strain B0541 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>       | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG024134.1 |
| <a href="#">Bacterium strain B0559 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>       | 1062      | 1062        | 96%         | 0.0     | 98.83%     | MG024135.1 |

U.S. National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

BLAST+ » blastn suite » results for RID-Y9F8BYX016

Job Title: B-165\_F  
RID: Y9F8BYX016  
Program: BLASTN  
Database: nt  
Query ID: KJ1Query\_44923  
Description: B-165\_F  
Molecule type: dna  
Query Length: 593

Sequences producing significant alignments

| Description   | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession  |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| <a href="#">Uncultured bacterium clone NC41102NCH23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>              | 741       | 741         | 96%         | 0.0     | 89.84%     | EU550820.1 |
| <a href="#">Uncultured archaeon sp.16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>                               | 736       | 736         | 96%         | 0.0     | 89.49%     | JF733194.1 |
| <a href="#">Uncultured bacterium clone C15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>                       | 689       | 689         | 95%         | 0.0     | 89.01%     | DQ288207.1 |
| <a href="#">Uncultured bacterium clone RP50_1aa02412 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>             | 713       | 713         | 96%         | 0.0     | 88.81%     | EU472721.1 |
| <a href="#">Uncultured Enterobacteriaceae bacterium clone BKF315 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> | 713       | 713         | 96%         | 0.0     | 88.78%     | JF733200.1 |
| <a href="#">Uncultured bacterium clone RP50_1aa02a06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>             | 710       | 710         | 96%         | 0.0     | 88.69%     | EU778502.1 |
| <a href="#">Uncultured bacterium clone RP50_1aa02a06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>             | 708       | 708         | 96%         | 0.0     | 88.64%     | EU778500.1 |
| <a href="#">Uncultured bacterium clone RP50_1aa02a03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>             | 708       | 708         | 96%         | 0.0     | 88.64%     | EU778499.1 |
| <a href="#">Uncultured bacterium clone p48712/seq167 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>             | 706       | 706         | 96%         | 0.0     | 88.49%     | EU500783.1 |
| <a href="#">Uncultured bacterium clone RP50_1aa02a01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>             | 702       | 702         | 96%         | 0.0     | 88.47%     | EU778493.1 |

Lampiran 5. Lokasi Pengambilan Sampel





KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933  
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

**KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI**

Nama : Malik Nuris Su'aidi  
NIM : 15620077  
Program Studi : Biologi  
Semester : Ganjil (IX)  
Pembimbing : Romaidi, M.Si., D.Sc.  
Judul Skripsi : Isolasi dan Identifikasi Bakteri Resisten Selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) dari sedimen Mangrove pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo, Jawa Timur.

| NO. | TANGGAL    | URAIAN KONSULTASI         | TTD PEMBIMBING |
|-----|------------|---------------------------|----------------|
| 1.  | 14-08-2019 | Konsultasi BAB I, II, III | 1.             |
| 2.  | 15-08-2019 | ACC BAB I, II, III        | 2.             |
| 3.  | 03-12-2019 | Konsultasi BAB IV         | 3.             |
| 4.  | 05-12-2019 | ACC Skripsi               | 4.             |

Pembimbing Skripsi

M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I  
NIPT.20142011409



Malang, 26 Desember 2019

Ketua Jurusan,

Romaidi, M.Si., D.Sc

NIPT.19810201 200901 1 019



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933  
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

**KARTU KONSULTASI SKRIPSI**

Nama : Malik Nuris Su'aidi  
NIM : 15620077  
Program Studi : Biologi  
Semester : Ganjil (IX)  
Pembimbing : Romaidi, M.Si., D.Sc.  
Judul Skripsi : Isolasai dan Identifikasi Bakteri Resisten Selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) dari sedimen Mangrove pantai Banyuglugur Kabupaten Situbondo, Jawa Timur.

| NO. | TANGGAL    | URAIAN KONSULTASI                      | TTD PEMBIMBING |
|-----|------------|--|----------------|
| 1.  | 09-01-2019 | Konsultasi judul skripsi               | 1. ✓           |
| 2.  | 14-01-2019 | Revisi judul skripsi                   | 2. ✓           |
| 3.  | 15-01-2019 | Konsultasi BAB I dan III               | 3. ✓           |
| 4.  | 13-02-2019 | Konsultasi BAB II                      | 4. ✓           |
| 5.  | 04-08-2019 | Revisi BAB I II dan III                | 5. ✓           |
| 6.  | 14-08-2019 | ACC Proposal                           | 6. ✓           |
| 7.  | 20-11-2019 | Konsultasi BAB IV                      | 7. ✓           |
| 8.  | 03-11-2019 | Revisi BAB IV                          | 8. ✓           |
| 9.  | 05-11-2019 | Konsultasi BAB IV V dan Daftar Pustaka | 9. ✓           |
| 10. | 02-12-2019 | Konsultasi analisis data dan lampiran  | 10. ✓          |
| 11. | 05-12-2019 | ACC Skripsi                            | 11. ✓          |

9.9 Pembimbing Skripsi

  
Romaidi, M.Si., D.Sc

NIP. 19810201 200901 1 019



Malang, 26 Desember 2019

Ketua Jurusan,

Romaidi, M.Si., D.Sc

NIP. 19810201 200901 1 019