



TUGAS AKHIR - RE 141581

# DEKONSENTRASI CHROMIUM PADA LIMBAH CAIR MENGGUNAKAN KONSORSIUM BAKTERI DAN MIKROALGA DENGAN SISTEM HIGH RATE ALGAL REACTOR

**MALIK BERLIANTO**  
**0321144000065**

**DOSEN PEMBIMBING**  
**Bieby Vojjant Tangahu, ST., MT., Ph.D.**

**DEPARTEMEN TEKNIK LINGKUNGAN**  
**Fakultas Teknik Sipil, Lingkungan, dan Kebumihan**  
**Institut Teknologi Sepuluh Nopember**  
**Surabaya 2018**





TUGAS AKHIR - RE 141581

# DEKONSENTRASI CHROMIUM PADA LIMBAH CAIR MENGGUNAKAN KONSORSIUM BAKTERI DAN MIKROALGA DENGAN SISTEM HIGH RATE ALGAL REACTOR

**MALIK BERLIANTO**  
**0321144000065**

**DOSEN PEMBIMBING**  
**Bieby Vojjant Tangahu, ST., MT., Ph.D.**

**DEPARTEMEN TEKNIK LINGKUNGAN**  
**Fakultas Teknik Sipil, Lingkungan, dan Kebumihan**  
**Institut Teknologi Sepuluh Nopember**  
**Surabaya 2018**





FINAL PROJECT - RE 141581

**DECONCENTRATION OF CHROMIUM  
CONTAINING IN WASTEWATER USING  
BACTERIA AND MICROALGAE CONSORTIA  
WITH HIGH RATE ALGAL REACTOR SYSTEM**

**MALIK BERLIANTO  
0321144000065**

**DOSEN PEMBIMBING  
Bieby Vojjant Tangahu, S.T., M.T., Ph.D.**

**DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING  
Faculty of Civil, Environmental, and Geo Engineering  
Institute of Technology Sepuluh Nopember  
Surabaya 2018**



**LEMBAR PENGESAHAN**

**DEKONSENTRASI CHROMIUM PADA LIMBAH CAIR  
MENGUNAKAN KONSORSIUM BAKTERI DAN MIKROALGA  
DENGAN SISTEM HIGH RATE ALGAL REACTOR**

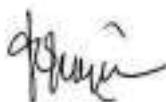
**TUGAS AKHIR**

Diajukan sebagai Salah Satu Syarat  
untuk Memenuhi Gelar Sarjana Teknik  
pada  
Program Studi S-1 Departemen Teknik Lingkungan  
Fakultas Teknik Sipil, Lingkungan, dan Kebumihan  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh :

**MALIK BERLIANTO**  
NRP. 0321144000065

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir



Biety Vojiant Tangahu, S.T., M.T., Ph.D.  
NIP. 19710818 199703 2 001





# **DEKONSENTRASI CHROMIUM PADA LIMBAH CAIR MENGUNAKAN KONSORSIUM BAKTERI DAN MIKROALGA DENGAN SISTEM HIGH RATE ALGAL REACTOR**

Nama Mahasiswa : Malik Berlianto  
NRP : 03211440000065  
Departemen : Teknik Lingkungan  
Dosen Pembimbing : Bieby Voijant Tangahu, S.T, M.T, Ph.D.

## **ABSTRAK**

Pencemaran yang disebabkan oleh logam berat dewasa ini merupakan masalah lingkungan yang sangat serius. Salah satu pencemaran logam berat pada badan air berasal dari kromium yang merupakan hasil utama dari beberapa industri. Kromium merupakan salah satu pencemar lingkungan yang sulit disisihkan dari perairan karena sifatnya yang terlarut dan tidak stabil. Proses biologis digunakan sebagai solusi dari permasalahan tersebut. Dengan menggunakan konsorsium bakteri dan mikroalga pada sistem High Rate Algal Reactor (HRAR), diharapkan terjadi penurunan kadar kromium dengan proses biosorpsi dan simbiosis mutualisme oleh kedua mikroorganisme tersebut.

Pada penelitian ini akan digunakan konsorsium antara bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* yang diketahui mampu melakukan penyisihan terhadap logam berat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi kromium minimum yang menghambat dan toleran terhadap *Azotobacter* S8 dan *Chlorella vulgaris*, persentase penyisihan kromium oleh konsorsium, serta komposisi terbaik antar kedua mikroorganisme tersebut dalam menyisihkan pencemar. Variabel yang digunakan dalam %:% adalah variasi komposisi mikroorganisme (50:50, 75:25, dan 25:75) dan variasi komposisi konsorsium terhadap media pencemar dalam reaktor uji (5:95 dan 10:90). Konsentrasi logam kromium yang digunakan sebanyak satu konsentrasi yang disesuaikan dengan hasil uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Range Finding Test (RFT). Konsentrasi logam kromium yang digunakan pada uji MIC

dan RFT (dalam mg/L) adalah 0, 17, 42, 85, 169, dan 339. Parameter yang diukur adalah pH, suhu, salinitas, konsentrasi total kromium, jumlah sel mikroalga dan jumlah koloni bakteri.

Hasil uji MIC dan uji RFT menunjukkan pertumbuhan kedua mikroorganisme terhambat pada konsentrasi kromium 42 mg/L dan toleran pada 17 mg/L. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan terbaik penyisihan kromium terjadi pada reaktor dengan variasi komposisi bakteri : mikroalga sebesar 50% : 50% dan inokulum awal : media tercemar sebesar 5% : 95% yang mampu menyisihkan kromium sebesar 18,68%. Berdasarkan hasil uji statistik, kedua variabel tidak memberikan pengaruh terhadap hasil penurunan logam kromium yang ditunjukkan dengan nilai P-value > 0,05. Nilai kalor bakar yang dihasilkan dari biomassa penyisihan terbaik sebesar 4.435,10 kkal/kg sehingga dapat dijadikan sebagai prekursor awal ketersediaan bahan bakar alternatif.

**Kata kunci : Azotobacter S8, Chlorella vulgaris, High Rate Algal Reactor, Konsorsium, Kromium**

# **DECONCENTRATION OF CHROMIUM CONTAINING IN WASTEWATER USING BACTERIA AND MICROALGAE CONSORTIA WITH HIGH RATE ALGAL REACTOR SYSTEMS**

Nama Mahasiswa : Malik Berlianto  
NRP : 0321144000065  
Departemen : Teknik Lingkungan  
Dosen Pembimbing : Bieby Voijant Tangahu, S.T, M.T, Ph.D.

## **ABSTRACT**

Heavy metal pollution has recently gained serious attention by means of environmental issue. One of the heavy metal pollution cases in natural water environment is chromium, which is released by several industries. Chromium is one of the most difficult environmental pollutants to be removed due to its dissolved and unstable properties. Bioremediation using a consortium of bacteria and microalgae in the High Rate Algal Reactor (HRAR) system can be expected to decrease chromium concentration. The treatment includes biosorption process and mutualism symbiosis of both microorganisms. In this study a consortium between *Azotobacter* S8 bacteria and *Chlorella vulgaris* microalgae were used to perform to remove the heavy metal.

This study use a consortium between *Azotobacter* S8 bacteria and *Chlorella vulgaris* microalgae which are known able to perform allowance for heavy metals. The purpose of this study was to determine minimum chromium concentration tolerant to *Azotobacter* S8 and *Chlorella vulgaris*, chromium removal percentage by consortium, as well as the best composition between the two microorganisms in removing pollutants. Evaluation was done based on percentage ratio of *Azotobacter* S8 and *Chlorella vulgaris* composition (50:50, 75:25, and 25:75) and ratio of consortium to the pollutant media tested (5:95 and 10:90). The concentration of chromium metal was adjusted according to the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Range Finding Test (RFT) test results. The chromium metal concentrations used in the MIC and RFT tests (in mg / L) were 0,

17, 42, 85, 169, and 339. pH, temperature, total chromium concentration, microalgae cell count and bacterial colonies were monitored during the experiments.

The results showed that the highest chromium removal was 18.68% that occurred in reactors of 50:50 ratio (bacterial composition:microalgae) and 5:95 (consortium : pollutant media) with 17 mg/L of chromium initial concentration. Both of variables did not give significant effect to the result of chromium removal (P-value > 0,05). Burning calorific value resulting from the best deconcentration process biomass of 4,435.10 kcal / kg. This value can serve as the initial precursor of the availability of alternative fuels.

**Keywords: Azotobacter S8, Chlorella vulgaris, High Rate Algal Reactor, Chromium, Consortium**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya ucapkan kepada Allah SWT karena atas Rahmat dan Karunia-Nya saya dapat menyelesaikan laporan tugas akhir dengan judul “Dekonsentrasi Kromium Pada Limbah Cair Menggunakan Konsorsium Bakteri dan Mikroalga Dengan Sistem High Rate Algal Reactor” ini dengan lancar.

Atas bimbingan dan pengarahan yang telah diberikan hingga terselesaikannya laporan tugas akhir ini, saya menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ibu Bieby Voijant Tangahu, S.T, M.T, Ph.D. selaku Dosen Pembimbing tugas akhir, terima kasih atas kesediaan, kesabaran, bantuan, bimbingan, serta ilmu yang telah diberikan,
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Sarwoko Mangkoedihardjo, M.Sc.ES, Ibu Ir. Atiek Moesriati, M.Kes, serta Ibu Ipung Fitri Purwanti, S.T, M.T, Ph.D. selaku Dosen Penguji tugas akhir, terima kasih atas seluruh saran, bimbingan, serta kritik yang membangun,
3. Ibu Hurun In, Ibu Mery Susilowati, Bapak Hadi, Bapak Affan, dan segenap laboran serta civitas akademika Teknik Lingkungan yang senantiasa membantu dan memfasilitasi selama berada di laboratorium,
4. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Remediasi Lingkungan khususnya Patricia Agnes Hutabarat, Gilang Rezha Mahardika, Khonza Rofifah, Devita Yulisa Simanjuntak, M. Sultanul Adzkar, Adriana Obenu, Anindita Sari Pertiwi, dan segenap teman-teman lainnya, Terima Kasih atas kesediaannya untuk menemani, membantu, dan mendengarkan keluh kesah selama pengerjaan tugas akhir ini.

Tak lupa pula saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada kedua Orang Tua saya, Bapak Tjipto Rahardjo dan Ibu Suhestri Kurniawati, saudara saya Suciati Nuraini, serta segenap

keluarga Saya yang telah memberikan dukungan dan doa selama pengerjaan tugas akhir ini. Tugas akhir ini saya persembahkan khusus untuk kalian semua.

Saya menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan tugas akhir ini. Oleh karena itu, Saya menerima saran maupun kritik yang membangun agar penulisan laporan tugas akhir ini menjadi lebih baik dan bermanfaat bagi bersama serta perkembangan sains dan teknologi khususnya di bidang lingkungan, di masa yang akan datang.

Surabaya, Juli 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	vii
ABSTRAK .....	ix
ABSTRACT .....	xi
KATA PENGANTAR .....	xiii
DAFTAR ISI .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvii
DAFTAR TABEL .....	xx
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	xxiv
1.1 Latar Belakang .....	25
1.2 Rumusan Masalah .....	28
1.3 Tujuan .....	28
1.4 Ruang Lingkup .....	29
1.5 Manfaat .....	30
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	33
2.1 Karakteristik Kromium dan Pencemaran Kromium .....	33
2.2 Karakteristik Azotobacter sp. ....	34
2.3 Karakteristik Chlorella vulgaris .....	35
2.4 Pertumbuhan dan Perkembangan Azotobacter sp. ....	37
2.5 Pertumbuhan dan Perkembangan Chlorella vulgaris .....	38
2.6 High Rate Algal Reactor (HRAR) .....	43
2.7 Mekanisme Dekonsentrasi dengan Azotobacter S8 dan Chlorella vulgaris .....	44
2.8 Penelitian Terdahulu .....	49
BAB 3 METODE PENELITIAN .....	51
3.1 Kerangka Penelitian .....	51
3.2 Tahapan Penelitian .....	54
3.2.1 Ide Studi .....	54
3.2.2 Studi Literatur .....	54
3.2.3 Persiapan Penelitian .....	55

3.2.4 Uji Penyisihan Logam Kromium dan Analisis Parameter .....	63
3.2.5 Analisis Data dan Pembahasan .....	67
3.2.6 Kesimpulan dan Saran .....	67
BAB 4 PEMBAHASAN.....	68
4.1 Uji Laju Pertumbuhan Azotobacter S8 .....	69
4.2 Tahap Propagasi dan Uji Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris .....	70
4.2.1 Hasil Uji Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris .....	70
4.3 Penelitian Utama .....	100
4.3.1 Uji Penyisihan Logam Berat Kromium.....	100
4.3.1.1 Suhu .....	101
4.3.1.2 pH .....	102
4.3.1.3 Salinitas .....	104
4.3.1.4 Jumlah Sel Mikroalga .....	105
4.3.1.5 Jumlah Koloni Bakteri .....	106
4.3.1.6 Total Kromium .....	115
4.3.2 Uji Statistik .....	121
4.3.3 Potensi Bahan Bakar Alternatif.....	123
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....	127
5.1 Kesimpulan .....	127
5.2 Saran .....	128
DAFTAR PUSTAKA.....	129
BIOGRAFI PENULIS .....	203

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Azotobacter sp. ....	34
Gambar 2. 2 Chlorella vulgaris .....	36
Gambar 2. 3 Kurva Pertumbuhan Bakteri Azotobacter S8 .....	37
Gambar 2. 4 Kurva Pertumbuhan Chlorella vulgaris.....	39
Gambar 2. 5 High Rate Algal Ponds (HRAP) milik Cyanotech Corporation (USA) .....	43
Gambar 2. 6 Proses Sintesis Glutathione (GSH) .....	47
Gambar 2. 7 Struktur Kimia (a) Fitokelatin, (b) Glutathione, dan (c) gammaglutamylcysteine .....	48
Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian.....	53
Gambar 3. 2 Reaktor Propagasi.....	60
Gambar 3. 3 Grafik Laju Pertumbuhan Bakteri .....	61
Gambar 3. 4 Uji MIC dengan Metode Screening .....	62
Gambar 3. 5 Reaktor Uji Penyisihan Kromium.....	66
Gambar 4. 3 Kurva Laju Pertumbuhan Bakteri Azotobacter S8..	69
Gambar 4. 4 Kondisi lingkungan uji coba laju pertumbuhan Chlorella vulgaris ke-1 (a) Penempatan reaktor propagasi (b) Pengaturan intensitas cahaya menggunakan lux meter HS1010.....	72
Gambar 4. 5 Grafik Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris Berdasarkan Nilai Klorofil A pada Percobaan Kedua .....	75
Gambar 4. 6 (a) Proses inokulasi saat propagasi dilakukan secara aseptik dan steril pada Laminar Air Flow (b) Hasil uji salinitas air laut komersil yang digunakan sebagai media kultur .....	77
Gambar 4. 7 Grafik Suhu Media Kultur Pada Uji Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris .....	79
Gambar 4. 8 Grafik pH Media Kultur Pada Uji Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris .....	80
Gambar 4. 9 Grafik Nilai Salinitas Media Kultur Pada Uji Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris .....	82

Gambar 4. 10 Grafik Nilai Optical Density Pada Uji Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris .....	83
Gambar 4. 11 Haemocytometer Nebauer Improved .....	84
Gambar 4. 12 Kamar – Kamar Baca Yang Terlihat Pada Mikroskop .....	85
Gambar 4. 13 Grafik Jumlah Sel Chlorella vulgaris Pada Uji Laju Pertumbuhan .....	85
Gambar 4. 14 Perbedaan Sel Mati dan Sel Hidup Yang Terlihat Pada Mikroskop.....	86
Gambar 4. 15 Hubungan Nilai Jumlah Sel Terhadap Optical Density pada Variasi Inokulum Chlorella 10% .....	87
Gambar 4. 16 Grafik Klorofil A Pada Uji Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris .....	88
Gambar 4. 17 Grafik Hubungan Nilai Klorofil A Dengan Optical Density .....	89
Gambar 4. 18 Grafik Pertumbuhan Chlorella vulgaris Pada Uji RFT.....	98
Gambar 4. 19 Grafik Suhu Harian Tiap Reaktor .....	102
Gambar 4. 20 Grafik pH Harian Tiap Reaktor .....	103
Gambar 4. 21 Grafik Nilai Salinitas Harian Tiap Reaktor.....	104
Gambar 4. 22 Grafik Jumlah Sel Mikroalga Harian Tiap Reaktor .....	105
Gambar 4. 23 Grafik Jumlah Koloni Bakteri Tiap Reaktor .....	108
Gambar 4. 24 Beberapa Morfologi Koloni Azotobacter .....	109
Gambar 4. 25 Morfologi Azotobacter Pada Pewarnaan Gram..	110
Gambar 4. 26 Hasil Pewarnaan Gram Pada Inokulat Awal .....	112
Gambar 4. 27 Hasil Uji SEM pada Sel Chlorella vulgaris.....	113
Gambar 4. 28 Hasil Identifikasi Associated-Bacteria pada Chlorella vulgaris .....	114
Gambar 4. 29 Persentase Penyisihan Logam Berat Kromium oleh Konsorsium Bakteri dan Mikroalga.....	116
Gambar 4. 30 Diagram Pourbaix Kromium .....	117
Gambar 4. 31 Hasil Uji ANOVA Pada Kedua Variabel.....	121
Gambar 4. 32 Hasil Grouping Kedua Variabel .....	122

Gambar 4. 33 (a) Biomassa Kering Hasil Reaktor dan (b)  
Biomassa Kering *Chlorella vulgaris* Hasil Stok .... 125

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

## DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Penelitian Terdahulu .....	49
Tabel 3. 1 Variabel Perlakuan antara Komposisi Konsorsium dengan Variasi Komposisi Konsorsium Terhadap Media Pencemar dalam Reaktor Uji.....	65
Tabel 4. 1 Hasil Pengamatan Uji Laju Pertumbuhan <i>Chlorella vulgaris</i> Percobaan ke-1.....	72
Tabel 4. 2 Hasil Pengamatan Uji Laju Pertumbuhan <i>Chlorella vulgaris</i> Percobaan ke-2.....	74
Tabel 4. 3 Hasil Pengamatan Fisik Uji Laju Pertumbuhan <i>Chlorella vulgaris</i> .....	78
Tabel 4. 4 Hasil Uji Minimum Inhibitory Concentration Terhadap <i>Azotobacter S8</i> pada Konsentrasi Kromium 0, 17, dan 42 mg/L .....	92
Tabel 4. 5 Hasil Uji Minimum Inhibitory Concentration Terhadap <i>Azotobacter S8</i> pada Konsentrasi Kromium 85, 169, dan 339 mg/L .....	93
Tabel 4. 6 Skoring Pertumbuhan Bakteri Pada Uji MIC .....	96
Tabel 4. 7 Jumlah Sel <i>Chlorella vulgaris</i> Pada Uji RFT .....	97
Tabel 4. 8 Hasil Pengamatan Fisik Uji Range Finding Test.....	98
Tabel 4. 9 Sampel Pewarnaan Gram .....	110
Tabel 4. 10 Hasil Pewarnaan Gram .....	111
Tabel 4. 11 Kadar Total Kromium Dengan Metode AAS .....	115

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>LAMPIRAN A. PEMBUATAN REAGEN DAN PROSEDUR ANALISIS</b> .....	147
Lampiran A.1. Tahapan Pembuatan Media NA (Nutrient Agar)	147
Lampiran A.2. Tahapan Pembuatan Media NB (Nutrient Broth)	150
Lampiran A.3. Tahapan Pembuatan Air Salin 0,85%.....	152
Lampiran A.4. Tahapan Pembuatan Larutan Stock Kromium...	154
Lampiran A.5. Tahapan Peremajaan Isolat Bakteri .....	156
Lampiran A.6. Tahapan Uji MIC (Minimum Inhibitory Concentration) .....	158
Lampiran A.7. Tahapan Propagasi Mikroalga .....	161
Lampiran A.8. Tahapan Uji RFT (Range Finding Test).....	165
Lampiran A.9. Tahapan Inokulasi Mikroorganisme ke Media yang Mengandung Kromium (Penelitian Utama)	167
Lampiran A.10. Tahapan Analisis Klorofil A .....	170
Lampiran A.11. Tahapan Perhitungan Jumlah Sel Mikroalga...	172
Lampiran A.12. Tahapan Uji CFU (Colony Forming Units) .....	175
Lampiran A.13. Teknik Sterilisasi Alat dan Material .....	177
<b>LAMPIRAN B. HASIL-HASIL PERHITUNGAN</b> .....	179
Lampiran B.1. Luas Permukaan Tumbuh Bakteri Pada Uji MIC	179
Lampiran B.2. Data Pengukuran pH, Suhu, Salinitas, Jumlah Sel Mikroalga, dan Log CFU Koloni Bakteri Pada Penelitian Pendahuluan dan Utama .....	180
Lampiran B.3. Hasil Uji AAS dan Bom Kalorimetri .....	186
<b>LAMPIRAN C. DOKUMENTASI PENELITIAN</b> .....	191
<b>LAMPIRAN D. DOKUMEN SIDANG UJIAN LISAN TUGAS AKHIR</b> .....	197
Lampiran D.1. Berita Acara Seminar Kemajuan Tugas Akhir...	197
Lampiran D.2. Formulir Perbaikan Seminar Kemajuan Tugas Akhir.....	198
Lampiran D.3. Berita Acara Sidang Ujian Lisan Tugas Akhir....	199
Lampiran D.4. Formulir Perbaikan Sidang Ujian Lisan TA.....	200
Lampiran D.4. Lembar Kegiatan Asistensi .....	201

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pencemaran logam berat, baik yang ditimbulkan oleh proses alami maupun aktivitas manusia, menjadi masalah lingkungan yang sangat serius. Akibat utama yang ditimbulkan oleh pencemaran logam berat yang disebabkan oleh limbah domestik maupun industri adalah tercemarnya sistem perairan (Farombi, et.al, 2007). Kromium merupakan salah satu logam berat yang banyak dihasilkan oleh industri, diantaranya berasal dari effluent industri electroplating, industri logam, penyamakan kulit, pendingin air, pulp, pemurnian bijih, serta petroleum (Suminten, et.al, 2014; Oves, et.al, 2013). Tingkat toksisitas dan mobilitas kromium ditentukan oleh bilangan oksidasinya. Di alam bebas, kromium ditemukan dalam bilangan oksidasi antara -2 hingga +6 (Evelyne dan Ravisankar, 2014). Namun, hanya kromium (VI) dan kromium (III) yang paling berpotensi sebagai kontaminan dalam berbagai sistem lingkungan (Kamaludeen, et.al, 2003).

Kromium (VI) yang selanjutnya disebut sebagai  $\text{Cr}^{6+}$  merupakan bentuk yang tidak stabil, sering ditemukan sebagai kromat atau  $(\text{CrO}_4)^{2-}$  dan atau dikromat  $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ , serta memiliki mobilitas dan toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan  $\text{Cr}^{3+}$  (Kamaludeen, et.al, 2003; Evelyne dan Ravisankar, 2014). Akibat mobilitasnya yang tinggi, kromium lebih sulit disisihkan dari perairan karena sifatnya yang terlarut. The United State Environmental Protection Agency (US EPA) telah mengidentifikasi kromium sebagai salah satu dari 17 bahan kimia yang merupakan ancaman terbesar bagi manusia serta mengklasifikasikannya sebagai karsinogen bagi manusia melalui pernafasan (USEPA, 2010). Oleh karenanya, pencemaran oleh kromium perlu menjadi perhatian yang serius. Hal ini dikarenakan, konsentrasi kromium terlarut yang umumnya

ditemukan pada badan air penerima dan air limbah dewasa ini telah melebihi baku mutu yang dipersyaratkan yakni berkisar antara 0,1-6,0 mg/L (Kamaludeen, et.al, 2003). Adapun konsentrasi tersebut akan bertambah seiring dengan banyaknya jumlah pencemar yang masuk ke dalam badan air. Di Republik Indonesia saja, konsentrasi kromium yang diizinkan untuk air minum adalah kurang dari 0,05 mg/L (Menteri Kesehatan RI, 2010) dan untuk air limbah adalah kurang dari 0,5 mg/L (Menteri Lingkungan Hidup RI, 2014). Konsentrasi yang ditemukan tentunya sangat melebihi baku mutu sehingga diperlukan pengolahan lebih lanjut terhadap kondisi tersebut.

Bioremediasi merupakan teknologi yang menjanjikan dan hemat biaya yang banyak digunakan saat ini untuk membersihkan tanah maupun air limbah yang mengandung kontaminan organik maupun anorganik (Kamaludeen, et.al, 2003). Bioremediasi dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai macam mikroorganisme seperti bakteri, fungi/jamur, maupun mikroalga melalui proses biologis. Prinsip dari proses bioremediasi sendiri adalah dengan memanfaatkan kemampuan mikroorganisme dalam melindungi diri dari logam berat (Kaur dan Kumar, 2014). Berdasarkan penelitian sebelumnya, bakteri *Azotobacter* (Pavel, et.al, 2011) dan mikroalga *Chlorella vulgaris* (Brady, et.al, 1994) diketahui mampu menyisihkan konsentrasi kromium. Namun sayangnya, penelitian terkait penyisihan logam berat oleh konsorsium bakteri dan mikroalga masih sangat jarang dilakukan. Padahal konsorsium antara bakteri (dalam hal ini bakteri aerobik) dan mikroalga dapat dilakukan karena secara umum keduanya dapat menimbulkan simbiosis mutualisme. Bakteri akan menyumbangkan CO<sub>2</sub> melalui hasil metabolisme tubuhnya dalam menyisihkan pencemar kepada mikroalga sebagai bahan baku dalam proses fotosintesis. Sedangkan sebaliknya mikroalga akan menghasilkan O<sub>2</sub> sebagai bahan metabolisme bakteri melalui proses fotosintesis. Serta keduanya

mampu mengubah bioavailabilitas logam berat melalui proses biosorpsi dan biotransformasi. (Mujtaba dan Lee, 2016).

*Chlorella* sp. merupakan jenis alga yang memiliki toleransi kadar pencemar yang cukup baik dan mudah didapatkan, sehingga alga *Chlorella* sering digunakan pada pengolahan air limbah (Man, et.al, 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Cervantes, et.al. pada tahun 2001 menemukan bahwa *Chlorella vulgaris* mampu mereduksi logam kromium hingga 83-99%. Di tahun 2011, Subashchandrabose, et.al. melakukan review penelitian yang dilakukan oleh Rose, et.al. (1998) terkait dengan pengolahan air limbah menggunakan konsorsium berbagai jenis Cyanobacteria (mikroalga biru-hijau) dengan bakteri. Dari penelitian tersebut dihasilkan konsorsium dapat mereduksi logam berat besi hingga 100%, seng sebesar 88%, dan tembaga hingga 79,2% pada air limbah industri penyamakan kulit dengan sistem High Rate Algal Pond (HRAP). Kemudian, pada tahun 2016, Imron dan Purwanti melakukan penelitian terkait dengan penyisihan  $Cr^{3+}$  menggunakan bakteri *Azotobacter* S8 dan *Bacillus subtilis* baik secara tunggal maupun konsorsium. Penelitian tersebut yang menghasilkan penyisihan tertinggi sebesar 10,53% oleh bakteri tunggal *Azotobacter* S8 selama pemaparan 4 jam. Oleh karenanya, pada penelitian ini akan dilakukan uji konsorsium antara bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* untuk menyisihkan kromium pada media perairan.

Pada penelitian ini, konsorsium akan dilakukan dalam High Rate Algal Reactor (HRAR) yang merupakan replikasi dari High Rate Algal Pond (HRAP) serta dimodifikasi untuk mendapatkan lingkungan percobaan steril. Karena kelebihanannya, HRAP merupakan salah satu pengolahan yang dapat diterapkan di Indonesia untuk menurunkan kandungan kromium pada air limbah. Pada penelitian ini akan dilakukan pencahayaan terhadap reaktor dengan durasi efektif 12 jam (Liang, et.al., 2013 ; Nacorda, et.al., 2010) menggunakan lampu fluorescent

(Maligan, dkk, 2015) dengan intensitas cahaya 6000-7000 Lux (Triatmojo dan Tangahu, 2017). Hal ini dilakukan untuk memberi pasokan cahaya pada *Chlorella vulgaris* dalam melakukan proses fotosintesis sehingga dapat menunjang pertumbuhan *Azotobacter* S8 dalam reaktor percobaan.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Adapun rumusan masalah yang diangkat pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Berapakah nilai konsentrasi kromium minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan metode minimum inhibitory concentration dan range finding test ?
2. Berapakah persentase dekonsentrasi logam berat kromium oleh konsorsium bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan berbagai variasi campuran ?
3. Berapakah komposisi terbaik konsorsium bakteri *Azotobacter* S8 dan mikrolaga *Chlorella vulgaris* dalam proses dekonsentrasi kromium ?

## **1.3 Tujuan**

Tujuan dari penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Menentukan nilai konsentrasi kromium minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan metode minimum inhibitory concentration dan range finding test.
2. Menentukan persentase dekonsentrasi logam berat kromium oleh konsorsium bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan berbagai variasi campuran.

3. Menentukan komposisi terbaik konsorsium bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* dalam proses dekonsentrasi kromium.

#### 1.4 Ruang Lingkup

Batasan-batasan yang menjadi ruang lingkup pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari spesies *Azotobacter* S8 yang diperoleh dari Laboratorium Remediasi Lingkungan, Departemen Teknik Lingkungan, FTSLK ITS. Sedangkan mikroalga yang digunakan pada penelitian ini adalah Chlorophyta atau mikroalga hijau dari spesies *Chlorella vulgaris* yang diperoleh dari hasil propagasi terhadap biakan primer yang dibeli dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) di Kabupaten Situbondo, Jawa Timur.
2. Limbah kromium yang menjadi sampel uji adalah limbah sintetis/buatan dengan bahan dasar larutan potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ).
3. Variabel konsentrasi kromium yang digunakan pada tahap penentuan nilai minimum inhibitory concentration dan range finding test dalam mg/L adalah 0, 10, 25, 50, 100, dan 200.
4. Variasi konsorsium *Azotobacter* S8 dan *Chlorella vulgaris* (v/v) yang digunakan (dalam %:%) adalah 50:50, 75:25, dan 25:75 serta variasi campuran konsorsium terhadap media pencemar (v/v) adalah 5:95 dan 10:90.
5. Proses remediasi oleh konsorsium bakteri-mikroalga dilakukan menggunakan High Rate Alga Reactor (HRAR) dengan sistem batch.
6. Parameter yang akan diuji pada penelitian ini adalah total kromium, pH, suhu, salinitas, jumlah koloni bakteri, dan jumlah sel mikroalga.

7. Analisis total kromium, dilakukan dengan metode Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) (Shimitzu 62016/17, Japan) di Laboratorium Penelitian dan Konsultasi Industri, Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI), Surabaya, Jawa Timur.
8. Biomassa yang dihasilkan dari komposisi terbaik konsorsium Azotobacter S8 dan Chlorella vulgaris dalam menyisihkan kromium pada penelitian ini akan diuji nilai kalor bakarnya dengan menggunakan bom kalorimeter di Laboratorium Penelitian dan Konsultasi Industri, Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI), Surabaya, Jawa Timur. untuk dapat mengetahui potensi kandungan bahan bakar alternatif yang dihasilkan dari biomassa tersebut.
9. Penelitian dilakukan dalam skala laboratorium.
10. Penelitian utama pada kegiatan tugas akhir ini dilakukan di dua laboratorium yaitu Laboratorium Remediasi Lingkungan dan Laboratorium Limbah Padat dan B3, Departemen Teknik Lingkungan, FTSLK ITS.

### **1.5 Manfaat**

Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Sebagai salah satu alternatif yang dapat digunakan pada penyisihan limbah cair mengandung logam berat kromium dengan menggunakan konsorsium bakteri dan mikroalga.
2. Memanfaatkan mikroalga yang masih belum maksimal pemanfaatannya untuk pengolahan limbah tercemar logam berat kromium.
3. Sebagai dasar dari penelitian lanjutan mengenai pengolahan air limbah tercemar logam berat kromium menggunakan konsorsium Azotobacter S8 dan Chlorella vulgaris pada skala lapangan menggunakan HRAR pilot scale.

4. Sebagai dasar penelitian lanjutan terkait dengan biokonversi energi dari biomassa konsorsium *Azotobacter* S8 dan *Chlorella vulgaris* sebagai prekursor ketersediaan biodiesel atau bahan bakar alternatif.
5. Sebagai referensi untuk penelitian lain yang berkaitan dengan penyisihan, logam berat kromium, bakteri *Azotobacter* S8, dan mikroalga *Chlorella vulgaris*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Karakteristik Kromium dan Pencemaran Kromium**

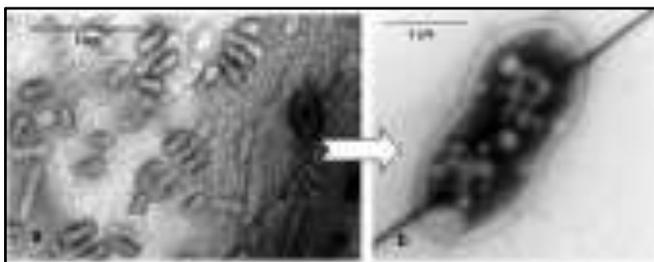
Kromium merupakan logam yang keras, tahan panas, elektropositif, dan penghantar panas yang baik. Kromium merupakan unsur transisi yang diberi lambang Cr dengan nomor atom 24 dan nomor massa 52. Kromium terletak pada golongan VIB di periode ke-4 dalam sistem periodik unsur. Titik didih kromium mencapai 2671°C dan titik leburnya mencapai 1907°C (Cheung dan Gu, 2007). Logam krom adalah salah satu jenis polutan logam yang bersifat toksik dan dalam tubuh manusia terakumulasi dalam bentuk ion  $\text{Cr}^{3+}$  dan  $\text{Cr}^{6+}$ . Kromium banyak ditemukan pada limbah industri tekstil, penyamakan kulit, dan gelas keramik (Suminten, et.al, 2005). Sumber logam berat kromium yang berasal dari alam jumlahnya sebanyak 30-40% seperti pelapukan batuan dan air hujan. Pembuangan limbah industri yang mengandung logam berat kromium akan meningkatkan konsentrasi kromium di perairan dan menyebabkan pencemaran air tanah. Kromium (VI) atau  $\text{Cr}^{6+}$  merupakan bentuk kromium yang mudah larut dalam air, sedangkan kromium (III) atau  $\text{Cr}^{3+}$  tingkat kelarutannya rendah dan cenderung teradsorpsi pada partikel padat dengan kisaran pH yang sesuai.

Toksistas logam berat secara umum terhadap makhluk hidup di perairan dipengaruhi oleh bentuk logam dalam air, keberadaan logam-logam lain, pengaruh lingkungan, dan kemampuan organisme beraklimatisasi terhadap bahan toksik dari logam (Frank, 1995). Sedangkan toksistas kromium sendiri dipengaruhi oleh bentuk oksidasi kromium, suhu, dan pH (Effendi, 2003). Perairan yang tercemar logam berat kromium akan membahayakan organisme perairan yang hidup di dalamnya, hal ini dikarenakan logam berat kromium tersebut akan terakumulasi dalam tubuh ikan, sehingga apabila ikan tersebut dikonsumsi oleh

manusia maka dapat terakumulasi dalam tubuh manusia. Akumulasi logam berat kromium di dalam tubuh manusia akan menimbulkan toksisitas akut dan kronis (Environmental Health Criteria, 1988). Konsentrasi kromium bebas di perairan mencapai 0,1-6 mg/L (Kamaludeen, et.al, 2003). Sedangkan konsentrasi kromium pada air limbah industri mencapai 25.000 mg/L (Mythili dan Khartikeyan, 2011)

## 2.2 Karakteristik *Azotobacter* sp.

*Azotobacter* sp. merupakan bakteri yang memiliki berbagai macam ukuran dan bentuk, termasuk bakteri gram negatif, polymorphic, serta merupakan bakteri fiksasi nitrogen. *Azotobacter* sp. adalah genus non-symbiont bakteri yang berlimpah di tanah, perairan, maupun sedimen (Aquilanti, et.al, 2004). dan mampu mengikat nitrogen bebas. Beberapa spesiesnya adalah bakteri siderophore dan produsen phytohormones (Kizilkaya, 2009) yang dengan demikian berpotensi digunakan sebagai pupuk hayati.



**Gambar 2. 1 *Azotobacter* sp.**

Sumber : Carpa, et.al, 2011

Secara umum, *Azotobacter* sp. diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria

Ordo : Rhodospirillase  
Famili : Pseudomonadaceae/Azotobacteraceae  
Genus : Azotobacter

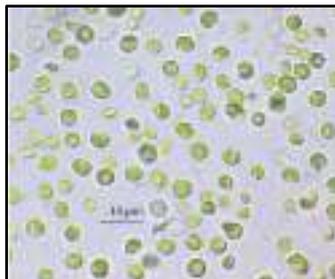
Keanekaragaman Azotobacter di habitatnya dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia tanah serta interaksi antar mikroorganisme yang berada di tanah (Lenart, 2012). Beberapa anggota Azotobacter bahkan memiliki toleransi pada lingkungan dengan salinitas yang tinggi (Akhter et al., 2012) dan toleran terhadap kromium (Safita dan Zulaika, 2015), sehingga juga berpotensi digunakan sebagai agen penyisihan kromium pada lingkungan dengan salinitas tinggi.

Kemampuan Azotobacter dalam melakukan penyisihan logam berat disebabkan oleh adanya komponen polimer ekstraseluler bernama eksopolisakarida (EPS) yang dalam hal ini memiliki sifat mengikat polutan logam (Erni, et.al, 2011). Eksopolisakarida merupakan copoliuran kaya alginat (Haug, et.al, 1967) yang terdiri dari asam -D-mannuronik dan asam -L-guluronik (Coma, 2013) dengan grup  $\beta$  fungsional hidroksil dan karboksil yang memungkinkan terjadinya deprotonasi pada reaksi reduksi Cr(VI) dengan grup fungsional karboksil bertindak sebagai elektron donor (Kantar, et.al, 2008). Oleh karena itu sifat inilah yang menyebabkan eksopolisakarida dapat mengadsorpsi logam karena EPS yang bermuatan negatif akan membentuk ligan bersama logam pada permukaan dinding sel (Erni et al., 2011).

### **2.3 Karakteristik Chlorella vulgaris**

Mikroalga hijau berbentuk kokus dari genus Chlorella merupakan mikroalga komersial yang paling penting dan secara komersial telah dibudidayakan di banyak negara di dunia (Champenois, et.al, 2014). Chlorella merupakan organisme autotrof dan eukaritoik. Sel Chlorella berbentuk bulat, hidup soliter, berukuran 2-10  $\mu\text{m}$  (Safi, et.al, 2014). Dalam sel Chlorella mengandung 50% protein, lemak serta vitamin A, B, D, E dan K,

di samping banyak terdapat pigmen hijau (klorofil) yang berfungsi sebagai katalisator dalam proses fotosintesis (Sachlan, 1982).



**Gambar 2. 2 Chlorella vulgaris**

Sumber : Ramaraj, et.al, 2014

Secara umum Chlorella vulgaris diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Protista
Divisi	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Chlorococcales
Famili	: Oocystaceae
Genus	: Chlorella

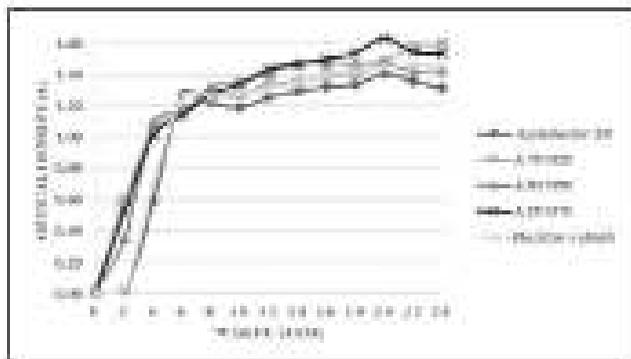
Chlorella vulgaris digolongkan sebagai tumbuhan renik air berdasarkan UU RI No. 9 tahun 1985 tentang Perikanan, yang mana Chlorella vulgaris termasuk dalam komoditas perikanan. Chlorella vulgaris tergolong tumbuhan tingkat rendah berukuran 3 – 15 mikron yang telah hidup di bumi sejak 2,5 milyar tahun yang lalu dengan sifat genetik yang tidak mengalami mutasi hingga sekarang (Wirosaputro, 2002)

Sel Chlorella umumnya dijumpai sendiri, atau terkadang bergerombol (Ramaraj, et.al, 2014). Protoplast sel dikelilingi oleh membran yang selektif, sedangkan di luar membran sel terdapat dinding yang tebal terdiri dari selulosa dan pektin. Di dalam sel terdapat suatu protoplast yang tipis berbentuk seperti cawan atau

lonceng dengan posisi menghadap ke atas. Warna hijau pada alga ini disebabkan karena kandungan klorofil a dan b dalam jumlah yang besar, di samping karotin dan xantofil (Rostini, 2007).

## 2.4 Pertumbuhan dan Perkembangan *Azotobacter* sp.

Pertumbuhan merupakan proses penambahan semua komponen di dalam sel hidup yang berlangsung secara teratur. Pertumbuhan bakteri merupakan pertambahan jumlah sel dan berat sel (Purwoko, 2007). Umumnya pertambahan dan pertumbuhan sel mikroba digambarkan dalam bentuk kurva pertumbuhan yang berbentuk sigmoid. Kurva pertumbuhan mikroba menggambarkan fase pertumbuhan secara bertahap yang dimulai sejak awal pertumbuhan hingga kematian sel bakteri (Suriawiria, 1990). Berikut ini merupakan kurva pertumbuhan bakteri *Azotobacter* S8 dan *Bacillus subtilis* baik dalam konsorsium maupun single culture berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Imron dan Purwanti pada tahun 2016.



**Gambar 2. 3 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Azotobacter* S8**

Sumber : Imron dan Purwanti, 2016

Menurut Brock dan Madigan (1991), fase pertumbuhan mikroba pada dasarnya terdiri dari :

a. Fase Adaptasi

Fase ini merupakan fase penyesuaian bakteri terhadap lingkungan yang baru (Muslimin, 1996). Fase ini juga seringkali disebut fase aklimatisasi ataupun lag phase. Pada fase ini tidak terjadi penambahan dan kenaikan jumlah sel tetapi peningkatan ukuran atau volume sel, peningkatan total protein seluruhnya, serta DNA (Lay, 1992).

b. Fase Eksponensial

Fase ini merupakan fase dimana mikroba membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva linier. Fase ini juga dapat disebut fase pertumbuhan logaritmik atau log phase. Pada fase ini bakteri sudah beradaptasi secara baik dengan lingkungan pertumbuhannya sehingga mempunyai waktu penggandaan yang lebih cepat dibandingkan fase sebelumnya dengan memproduksi lebih banyak protein (Rosmarkam dan Yuwono, 2002 ).

c. Fase Stasioner

Fase ini jumlah populasi sel bakteri tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan sel yang mati (Muslimin, 1996). Menurut Lay dan Hastowo (1992) hal ini terjadi karena berkurangnya jumlah nutrisi serta faktor-faktor yang terkandung di dalam jasad mikroba, sehingga membuat aktivitas pertumbuhan sampai pada titik maksimum.

d. Fase Kematian

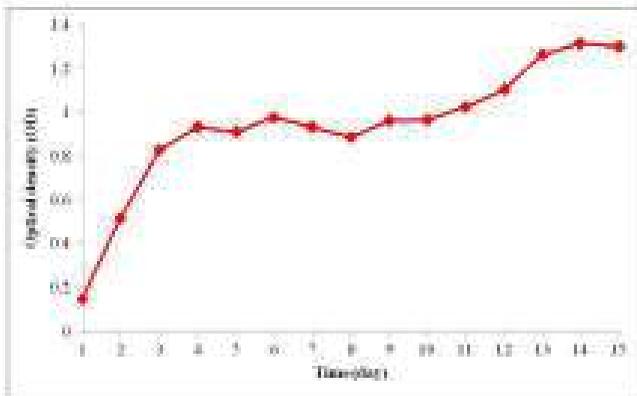
Fase ini merupakan akhir dari pertumbuhan bakteri, dimana jumlah bakteri menurun drastis sehingga grafik akan menuju kembali ke titik awal (Suriawiria, 1990). Penurunan populasi mikroba disebabkan karena autolisis sel dan penurunan energi seluler (Purwoko, 2007).

## **2.5 Pertumbuhan dan Perkembangan *Chlorella vulgaris***

*Chlorella* memiliki waktu regenerasi yang cepat. Sehingga, dalam waktu yang relatif singkat, perkembangan sel *chlorella* akan terjadi secara cepat terutama apabila terdapat

sumber energi berupa cahaya maupun nutrisi yang melimpah. Pada umumnya, perkembangan dan perbanyakan sel *Chlorella* terjadi dalam kurun waktu 4 – 14 jam tergantung pada lingkungan pendukungnya (Surawiria, 1986).

Sejumlah kecil *Chlorella vulgaris* yang diinokulasikan ke dalam medium kultur terbatas dan jumlah sel *Chlorella vulgaris* dihitung sebagai fungsi waktu, dapat diketahui pola pertumbuhan berdasarkan jumlah sel yang dapat dikelompokkan menjadi 5 fase yaitu fase tunda (lag phase), fase eksponensial (log phase), fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian (Fogg, 1975).



**Gambar 2. 4 Kurva Pertumbuhan *Chlorella vulgaris***

Sumber : Ramaraj, et.al., 2014

1. Fase Tunda (lag phase)

Fase tunda merupakan waktu yang diperlukan oleh *Chlorella vulgaris* yang diinokulasikan ke dalam sebuah media tumbuh untuk beradaptasi dengan lingkungannya. Fase ini juga dapat disebut fase aklimatisasi sebelum pembelahan dan perkembangbiakan sel dilakukan. Pada fase adaptasi sel mengalami defisiensi enzim atau koenzim, sehingga harus disintesis terlebih dahulu guna

berlangsungnya aktivitas biokimia sel selanjutnya (Madigan, et.al., 2000).

2. Fase Eksponensial (log phase)

Pada fase eksponensial, peningkatan jumlah sel berkembang pesat. Sel-sel pada fase ini membelah dengan kecepatan maksimum dan peningkatan aktivitas fotosintesis. Aktifitas fotosintesis tersebut menyebabkan meningkatnya produksi protein dan komponen-komponen lainnya pada protoplasma yang berperan dalam proses pertumbuhan. Kandungan protein pada fase ini memiliki jumlah yang lebih tinggi daripada fase stasioner (Fogg dan Thake, 1987).

3. Fase Stasioner

Fase stasioner terjadi dimana jumlah antara sel *Chlorella vulgaris* yang berkembang sebanding dengan yang mati. Pada fase ini perkembangan dan pertumbuhan sel berlangsung lambat (Madigan, et.al., 2000). Menurunnya laju pertumbuhan sel *Chlorella vulgaris* diakibatkan oleh kurangnya nutrisi dan terbentuknya senyawa metabolit sekunder, dimana senyawa tersebut akan terakumulasi di dalam media kultur dan menghambat metabolisme sel (Pelczar dan Chan, 1986).

4. Fase Kematian

Setelah fase stasioner, akan terjadi pengurangan jumlah sel secara bertahap. Sel-sel mati dengan kecepatan yang bervariasi, bergantung pada jenis dan kondisi lingkungan (Sarles, et.al, 1956). Adapun beberapa faktor yang dapat menyebabkan kematian sel adalah jumlah nutrisi yang berkurang, jumlah suplai  $\text{CO}_2$  dan  $\text{O}_2$  yang berkurang, perubahan pH media, dan rendahnya penetrasi cahaya yang dipengaruhi oleh kerapatan sel (Fogg dan Thake, 1987).

Perkembangan dan pertumbuhan *Chlorella vulgaris* tentunya tidak terlepas dari faktor-faktor yang mempengaruhinya diantaranya cahaya, salinitas, unsur hara, suhu, pH dan faktor

lainnya (Saavedra dan Voltolina, 2005). Unsur hara yang diperlukan *Chlorella vulgaris* terdiri atas unsur makro dan mikro, namun yang paling penting dan berpengaruh untuk menunjang pertumbuhan adalah nitrogen (N) dan fosfor (P). Nitrogen yang diperlukan oleh media kultur dapat diperoleh dari  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , dan lain-lain. Sedangkan fosfor yang diperlukan untuk membentuk asam nukleat, enzim, dan vitamin dapat diperoleh dari  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  (Tjahjo, et.al, 2002).

Keberadaan cahaya juga mempengaruhi pertumbuhan *Chlorella vulgaris* yang melakukan fotosintesis. Cahaya tersebut akan diserap oleh *Chlorella vulgaris* melalui pigmen Klorofil a selain juga oleh karotenoid dan xanthofil. Lampu TL dapat menggantikan cahaya matahari dan kisaran intensitas cahaya optimum adalah untuk perkembangan *Chlorella vulgaris* antara 2000-8000 Lux (Tjahjo, et.al, 2002). Nutrien, suhu, dan pH juga mempengaruhi pertumbuhan *Chlorella vulgaris*. Menurut Tjahjo, et.al. pada tahun 2002, suhu optimum pertumbuhan *Chlorella vulgaris* adalah berkisar antara 25 – 34°C. Sedangkan pH optimum pertumbuhannya adalah 7-8 (Krisanti, 2003). Selain itu, menurut Redfield (1934, 1958), kandungan senyawa organik pada tubuh sel fitoplankton laut (salah satunya adalah *Chlorella vulgaris*) memiliki rasio C:N:P sebesar 106:16:1 yang mana rasio tersebut dijadikan sebagai acuan kebutuhan nutrien pada sel mikroalga. Salinitas juga berperan penting untuk pertumbuhan *Chlorella vulgaris*. Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty pada tahun 1995, *Chlorella vulgaris* tumbuh optimal pada salinitas 25 – 30 ppt sementara pada salinitas 15 ppt tumbuh lambat dan tidak tumbuh pada salinitas 0 ppt dan 60 ppt.

Menurut Irfiansyah (2015) dan Anggraeni (2016) yang ditulis berdasarkan hasil praktik kerja lapangan di BPBAP Jepara Jawa Tengah dan BPBAP Situbondo Jawa Timur, kultur fitoplankton / mikroalga murni dimulai dari kegiatan isolasi dan dikembangkan sedikit demi sedikit secara bertingkat. Media kultur yang digunakan pada awalnya hanya beberapa mililiter saja

kemudian berangsur-angsur meningkat ke volume yang lebih besar hingga mencapai skala massal (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Berikut ini merupakan 3 jenis skala budidaya mikroalga yang secara umum digunakan untuk mendapatkan kultur stok *Chlorella vulgaris* murni atau dalam kata lain adalah teknik propagasi mikroalga.

#### 1. Skala Laboratorium

Pada skala laboratorium, terdapat beberapa jenis sistem kultivasi mikroalga yakni kultur agar / petri dish (tanpa aerasi), kultur testtube (tanpa aerasi), kultur Erlenmeyer 1-2 liter baik dengan aerasi maupun tanpa aerasi, dan kultur Carboy atau stoples 10 L dengan aerasi. Jenis yang paling sering digunakan adalah kultur Erlenmeyer 1-2 liter.

Kultur skala laboratorium dimulai dengan melakukan sterilisasi media dan alat berupa filtrat air laut dengan salinitas 30-35 ppt pada Erlenmeyer 1-2 liter menggunakan autoclave 121°C, 1,1 atm. Inokulum dicampurkan dengan perbandingan inokulum : media air laut sebesar 30 : 70. Kemudian ditambahkan pupuk Pro Analisis berupa pupuk Walne dan Vitamin (B12, B1, dan Biotin) sebanyak 1 mL/L media kultur. Seluruh kegiatan dilakukan secara aseptik dan steril. Kultur dikultivasi dengan penambahan aerasi secara terus menerus dan diberi pencahayaan menggunakan sinar artifisial.

#### 2. Skala Semi-Massal / Intermediet

Kultur semi-massal atau intermediet merupakan kultur lanjutan dari kultur murni/kultur laboratorium untuk mendapatkan stok yang lebih banyak. Pada kultur semi massal, proses dilakukan pada dibawah ruangan tertutup dengan atap transparan untuk mendapatkan cahaya matahari. Volume kultur semi-massal berkisar antara 100-500 liter. Bibit / inokulum awal merupakan hasil kultur laboratorium sebanyak 5-10% dari total volume media kultur.

Adapun pupuk yang digunakan berbeda dengan kultur laboratorium yakni campuran dari pupuk Pro Analisis (PA) dengan pupuk teknis.

3. Skala Massal

Pada skala massal, kultur dilakukan di ruang terbuka dan menggunakan kolam. Bibit yang digunakan merupakan hasil kultur skala intermediet. Sedangkan pupuk yang digunakan merupakan pupuk teknis.

## 2.6 High Rate Algal Reactor (HRAR)

High Rate Algal Reactor (HRAR) merupakan bentuk replikasi dari High Rate Algal Ponds (HRAP) yang dijalankan pada skala laboratorium (Gumilang dan Hermana, 2013). HRAP pertama kali diusulkan oleh Oswald dan Golueke pada tahun 1965 untuk mengolah air limbah perkotaan dan selanjutnya menjadi alternatif yang populer digunakan dalam mengolah air limbah di berbagai belahan dunia (Shelef, et.al., 1975). HRAP memiliki kelebihan pada biaya pengadaan, operasional dan pemeliharaan yang relatif lebih murah dan mudah daripada metode yang lain (Garcia, et.al, 2010).



**Gambar 2. 5 High Rate Algal Ponds (HRAP) milik Cyanotech Corporation (USA)**

Sumber : Munoz, et.al., 2006

HRAP secara konvensional merupakan saluran terbuka yang dilengkapi dengan aerator. Aerator tersebut berfungsi untuk mensirkulasi kandungan organik dan nutrisi yang ada di dalamnya. HRAP memiliki waktu kontak 2 hingga 6 hari (Mara, 2003). Memiliki kedalaman berkisar antara 0,2 hingga 0,6 meter dengan tujuan agar cahaya matahari dapat menembus hingga dasar kolam untuk sumber energi proses fotosintesis mikroalga. Beberapa faktor yang mempengaruhi kinerja HRAP ataupun HRAR yakni ketersediaan nutrisi, pengadukan (40-120 rpm), waktu kontak, kedalaman, temperatur, dan intensitas cahaya (Garcia, 2000).

## **2.7 Mekanisme Dekonsentrasi dengan *Azotobacter S8* dan *Chlorella vulgaris***

Pada dasarnya proses dekonsentrasi merupakan salah satu bagian dari teknik bioremediasi. Teknik bioremediasi sering digunakan untuk membersihkan lingkungan yang tercemar oleh logam berat, pestisida, hidrokarbon, maupun radioaktif. Bioremediasi adalah proses pembersihan lingkungan dari bahan tercemar dengan menggunakan material biologis seperti tumbuhan dan mikroba (USEPA, 1987). Bioremediasi logam berat oleh mikroba adalah proses dekonsentrasi melalui perubahan ion logam sehingga yang semula bersifat toksik akan berkurang tingkat toksisitasnya. Menurut Ahemad tahun 2012, bakteri yang toleran terhadap logam berat memiliki mekanisme untuk bertahan hidup antara lain berupa proses bioakumulasi, biotransformasi, dan biosorpsi. Keunggulan dari proses bioremediasi adalah ramah lingkungan, mampu membersihkan polutan dalam konsentrasi rendah, dan mengurangi penggunaan bahan-bahan kimia sebagai koagulan (Yazid, 2007).

Proses biosorpsi logam berat pada dasarnya adalah kemampuan sel untuk mengambil ion logam berat yang berada di

lingkungan sekitarnya (Triatmojo dkk, 2001). Organel sel yang paling banyak terlibat pada proses ini adalah dinding sel yang banyak mengandung polisakarida dan protein pada permukaannya (Ahemad, 2012). Proses ini merupakan transport pasif yang mana tidak melibatkan metabolisme sel dan tidak membutuhkan energi melainkan terjadi melalui proses difusi maupun osmosis. Selanjutnya akan terjadi proses biotransformasi logam berat oleh sel yang terjadi di dalam membran sel maupun sitoplasma sel. Pada proses ini, kromium yang telah masuk ke dalam sel akan bereaksi dengan reduktan intraseluler seperti askorbat dan glutathion sehingga kromium yang awalnya toksik akan berubah menjadi kurang toksik hingga tidak toksik. Proses yang terakhir adalah bioakumulasi yang mana sel akan mengambil ion logam secara aktif melalui siklus metabolismenya (Triatmojo dkk, 2001). Proses-proses tersebut melibatkan sulphate channel yang terdapat pada dinding sel sehingga kromium dapat terperap dan masuk ke dalam sel.

Bakteri yang telah diteliti mampu menyisihkan kadar kromium salah satunya *Azotobacter S8*. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk melakukan biosorpsi terhadap beberapa logam berat, termasuk kromium. *Azotobacter* diketahui toleran terhadap logam kromium hingga konsentrasi 50 mg/L (Imron dan Purwanti, 2016 ; Pavel, et.al, 2012). Kemampuan ini didukung oleh adanya polimer ekstraseluler berupa eksopolisakarida (EPS) yang memiliki sifat megikat logam.

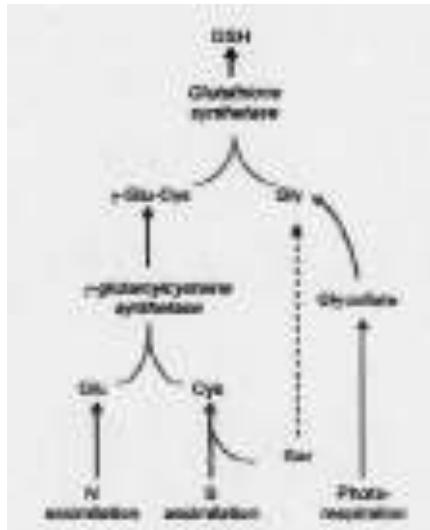
Kemampuan remediasi logam berat oleh mikroalga sangat baik bila dibandingkan dengan beberapa mikroba, jamur, karena struktur dinding sel alga terbentuk dari berbagai serat metrik polisakarida (Niczyporuk, et.al, 2012). Beberapa mikroalga mempunyai kemampuan untuk menjadi agen remediasi logam berat, salah satunya adalah *Chlorella vulgaris*. Kemampuan *Chlorella vulgaris* dalam menyerap logam berat ini didukung dengan kemampuan beradaptasi, bertumbuh dan juga ekonomis untuk dijadikan agen remediasi pada lingkungan tercemar. Selain

dapat digunakan untuk bioremediasi logam berat, mikroalga *Chlorella vulgaris* juga dapat digunakan sebagai prekursor ketersediaan biodiesel karena mengandung 20-50% lemak (Mata, et.al, 2010).

Menurut Purnamawati, et.al (2015), fitoplankton dapat digunakan sebagai agen kelat bagi logam berat yang terlarut dalam badan air. Dalam tubuh fitoplankton, terdapat beberapa senyawa organik, termasuk klorofil, yang diketahui mampu mengikat logam berat dengan membentuk senyawa kompleks melalui gugus-gugus yang reaktif terhadap logam berat tersebut seperti sulfidril dan amina. Melalui ikatan kompleks tersebut, logam berat akan menjadi lebih stabil dan terakumulasi di dalam sel fitoplankton. Adapun kandungan senyawa organik yang mampu berperan sebagai ligand adalah tidak sama pada setiap jenis fitoplankton. Hal ini bergantung pada kondisi fisiologis masing-masing sel fitoplankton.

Menurut Esmaeili (2015), *Chlorella vulgaris* dapat mensintesis protein pengkelat logam melalui proses aktif. Glutathione (GSH) dikenal efisien dalam melakukan detoksifikasi sel. GSH melindungi sel dengan mengurangi spesies oksigen reaktif (ROS) dan juga dengan mengikat logam. GSH sendiri merupakan gugus tripeptide yang hasil sintesis asam glutamat (Glu), sistein (Cys) dan glisin (Gly). GSH juga merupakan senyawa tiol utama yang diproduksi oleh binatang, tumbuhan, alga dan bakteri (Giovanelli et al.,1980, Noctor dan Foyer, 1998 dalam Esmaeili, 2015).

Sintesis  $\gamma$ -glutamilsistein berasal dari L-glutamat dan L-sistein yang dikatalisis oleh enzim  $\gamma$ glutamylcysteine sintetase. Kemudian, penambahan glisin akan dikatalisis oleh enzim glutathione synthetase untuk menghasilkan GSH. Biasanya sintesis terjadi di sitosol, kloroplas, vakuola dan mitokondria yang mana merupakan tempat asam amino diproduksi (Noctor dan Foyer 1998).

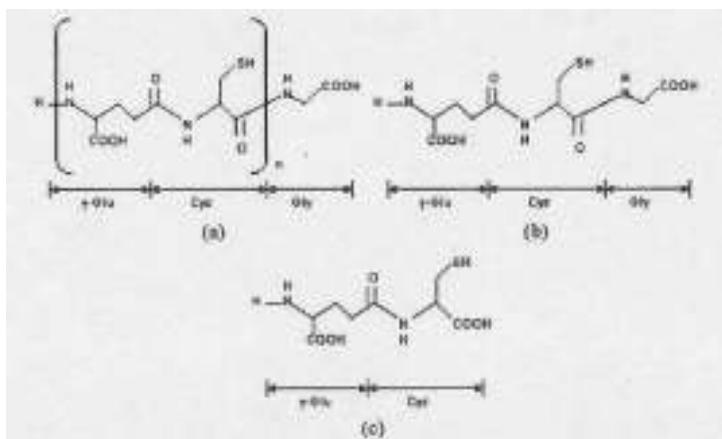


**Gambar 2. 6 Proses Sintesis Glutathione (GSH)**

Sumber : Noctor dan Foyer, 1998

Adapun fitokelatin merupakan hasil sintesis lanjutan dari GSH itu sendiri. Phytochelatins (PC) atau fitokelatin dikenal sebagai polipeptida kecil dengan struktur asam amino  $\gamma$  (Glu-Cys) n-Gly, dan dapat ditemukan pada tumbuhan, alga dan banyak jamur (Cobbett, 2000; Robinson, 1989 dalam Esmaeili, 2015). Phytochelatin diproduksi secara enzimatik oleh phytochelatin sintetase dari glutathione (GSH). Phytochelatin mampu melindungi sel dari toksisitas logam dengan menjadi agen pengkhelat ion logam dalam sel. Fitokelatin akan berikatan dengan logam melalui gugus thiol (-SH) yang ada pada kerangka utama gugusnya.

Oleh karena itu, GSH sangat penting untuk sintesis fitokelatin, yang mana konsentrasinya terkontrol dengan baik dalam sel mikroalga (Rijstenbilet dan Wijnholds, 1996; Morelli dan Scarano, 2001; Ahner et al., 2002 dalam Esmaeili, 2015). Produksi PC tergantung pada ion logam tertentu dan konsentrasinya pada tumbuhan dan alga.



**Gambar 2. 7 Struktur Kimia (a) Fitokelatin, (b) Glutathione, dan (c) gammaglutamylcysteine**

Sumber : Rama dan Rai, 2009

Berdasarkan penjelasan di atas maka penelitian ini dilakukan guna mengetahui potensi *Chlorella vulgaris* dan *Azotobacter S8* sebagai agen dekontaminasi logam berat (Cu, Cd, Cr, Zn) pada lingkungan perairan. Mekanisme interaksi yang dapat terjadi yakni bakteri akan menyumbangkan CO<sub>2</sub> melalui hasil metabolisme tubuhnya dalam menyisihkan nutrisi/pencemar kepada mikroalga sebagai bahan baku dalam proses fotosintesis, sedangkan sebaliknya mikroalga akan menghasilkan O<sub>2</sub> dengan proses fotosintesis sebagai bahan metabolisme bakteri (Mujtaba dan Lee, 2016). Selain itu, pada kondisi alamiah maupun lingkungan perairan buatan, mikroalga selalu berkaitan dengan bakteri (Mouget, et.al, 1995). Bakteri *Azospirillum* dan *Azotobacter* diketahui merupakan bakteri penggerak pertumbuhan bagi mikroalga yang secara signifikan mampu meningkatkan populasi fitoplankton dan tentunya berdampak besar bagi populasi ikan di perairan (Puente, et.al, 1999; Garg dan Bartnagar, 1999; Tripathy dan Ayyapan, 2005; Ali, et.al, 2011). Potensi dekontaminasi diukur berdasarkan

kemampuan tumbuh dan kemampuan menyerap logam berat yang diberikan dalam medium.

## 2.8 Penelitian Terdahulu

Pada dasarnya, penelitian sejenis masih cukup jarang dilakukan. Beberapa penelitian sejenis lebih mengutamakan penyisihan nutrisi oleh konsorsium bakteri dan mikroalga. Namun, juga terdapat beberapa penelitian sejenis yang memanfaatkan konsorsium bakteri dan mikroalga dalam proses penyisihan logam berat. Data lengkap mengenai penelitian terdahulu dapat dilihat pada Tabel 2.1.

**Tabel 2. 1 Penelitian Terdahulu**

No	Jenis Mikroalga	Jenis Bakteri	Jenis Logam Berat	Konsentrasi Maksimum (mg/L)	Efisiensi Penyisihan (%)	Rujukan
1	Spirulina platensis	Sulfat-reducing bacteria	Tembaga	500	79,2	Rose, et.al., 1998
			Seng	500	88,0	
			Besi	500	100	
2	Chlorella sp.	Rhodococcus sp.	Tembaga	0,04	62	Safonova, et.al., 2004
			Nikel	0,21	62	
			Seng	0,10	90	
			Besi	6,43	64	
			Mangan	0,20	70	
3	Chlorella sorokiniana	R. basilensis	Tembaga	20	57,5	Munoz, et.al., 2006
4	Bostrychia calliptera	Bakteri eksisting	Kromium	5 ppm	62,85	Gallego dan Salamanca, 2015
				10 ppm	68,55	

Beberapa penelitian tersebut memiliki metode yang berbeda-beda. Seperti Rose, et.al. pada tahun 1998 melakukan konsorsium antara mikroalga dan bakteri untuk menyisihkan logam pada efluen limbah industri penyamakan kulit menggunakan sistem High Rate Algal Pond (HRAP). Safonova, et.al. pada tahun 2004 melakukan konsorsium mikroalga Chlorella sp. terhadap bakteri R. Basilensis untuk menyisihkan logam pada air limbah tercemar minyak menggunakan sistem pilot instalation yakni penggunaan filter pasir dan lumpur dengan aliran kontinu pada suhu 22°C.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini akan menguji kemampuan bakteri *Azotobacter S8* dan mikroalga *Chlorella vulgaris* dalam sistem High Rate Alga Reactor (HRAR) sebagai agen penyisihan logam berat kromium (Cr) dengan sistem batch. Kromium yang akan disisihkan berasal dari limbah cair buatan yang mengandung kromium hexavalent ( $Cr^{6+}$ ). Setelah itu, akan dilakukan uji parameter berupa total logam berat kromium (Cr) yang disisihkan dengan metode Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), suhu, pH, salinitas, jumlah sel mikroalga, serta jumlah koloni bakteri. Terakhir akan dilakukan uji kalor bakar biomassa mikroalga-bakteri pada penyisihan limbah cair dengan komposisi terbaik menggunakan bom kalorimeter sebagai prekursor awal ketersediaan biodiesel dan atau bahan bakar alternatif. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi komposisi mikroalga dan bakteri serta komposisi konsorsium dan media pencemar dalam reaktor uji. Penelitian ini berskala laboratorium yang dilakukan di Laboratorium Remediasi Lingkungan dan Laboratorium Limbah Padat dan B3, Departemen Teknik Lingkungan, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

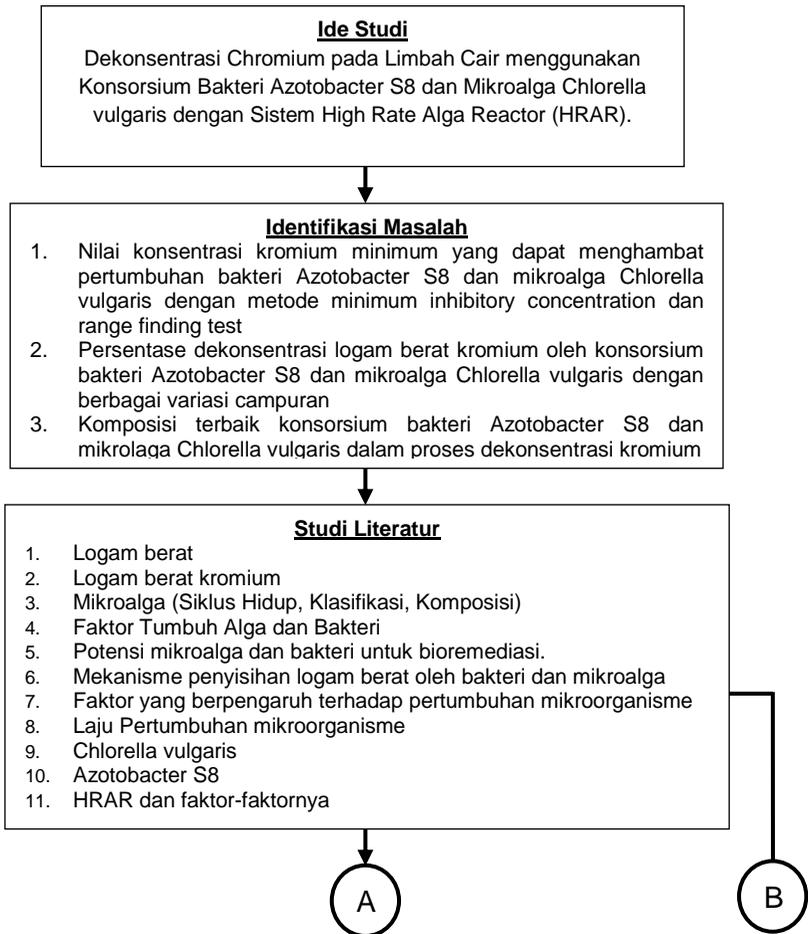
#### **3.1 Kerangka Penelitian**

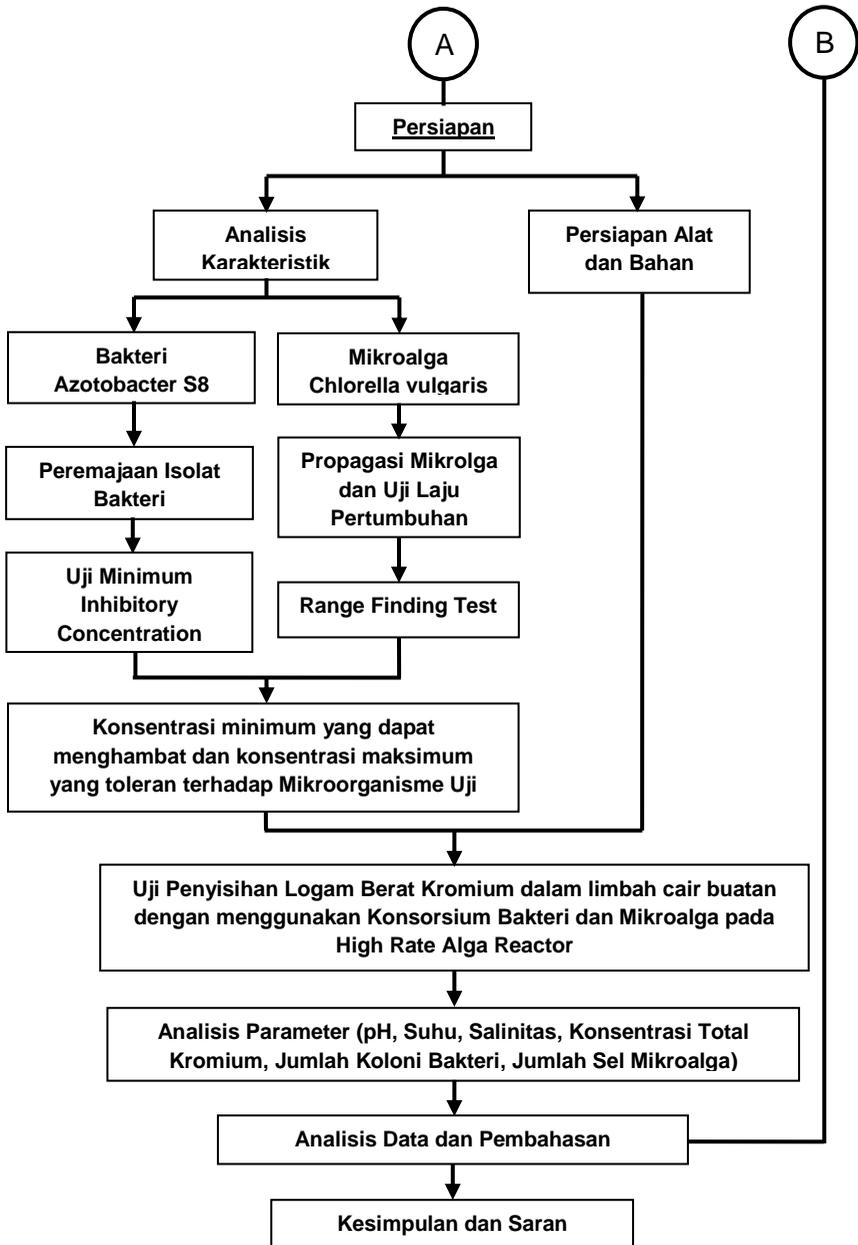
Metode penelitian merupakan acuan dalam melaksanakan penelitian, yang disusun berdasarkan pada pemikiran akan adanya permasalahan dari ide penelitian. Kerangka penelitian ini disusun dengan tujuan:

1. Sebagai gambaran awal untuk mengetahui tahapan-tahapan yang harus dilakukan dalam penelitian, dengan adanya kerangka penelitian secara sistematis yang digunakan dari awal penelitian sampai penulisan laporan tugas akhir.

2. Memudahkan dalam mengetahui hal-hal yang berkaitan dengan pelaksanaan penelitian demi tercapainya tujuan penelitian.
3. Memperkecil dan menghindari terjadinya kesalahan-kesalahan selama melakukan penelitian.

Kerangka penelitian selanjutnya secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 3.1.





Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

## **3.2 Tahapan Penelitian**

### **3.2.1 Ide Studi**

Penelitian ini dilatarbelakangi oleh pencemaran badan air oleh limbah cair yang mengandung kromium (Cr). Peristiwa tersebut sebagian besar berasal dari effluent industri yang menggunakan kromium sebagai bahan bakunya seperti industri electroplating, industri logam, penyamakan kulit, pendingin air, pulp, pemurnian bijih, serta petroleum. Dengan semakin banyaknya limbah yang terbentuk tentunya perlu dilakukan penanganan terhadap hal tersebut sehingga kromium yang dihasilkan oleh limbah industri dapat tersisihkan dan tidak mencemari sistem perairan. *Azotobacter S8* merupakan bakteri yang memiliki kadar toleransi cukup tinggi terhadap logam berat sehingga berpotensi untuk digunakan dalam proses bioremediasi logam berat kromium.

Di samping itu, penggunaan mikroalga di Indonesia masih kurang optimal. Padahal mikroalga juga merupakan agen bioremediasi yang cukup baik di beberapa penelitian sebelumnya. Oleh karena itu, beberapa faktor tersebut memunculkan ide penulis untuk mengolah air limbah tercemar logam berat kromium dengan menggunakan konsorsium bakteri *Azotobacter S8* dan mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan sistem High Rate Algal Reactor. Kemudian dianalisis efisiensi penurunan kadar logam berat yang dihasilkan serta biokonversi energi dari komposisi konsorsium dengan efisiensi terbaik.

### **3.2.2 Studi Literatur**

Studi literatur dilakukan untuk mendukung ide studi dan jalannya penelitian mulai dari awal hingga penyusunan laporan. Literatur yang telah dibaca nantinya dapat dijadikan acuan terhadap kadar pencemar yang akan ditambahkan. Selain itu, studi literatur dilakukan untuk mendapatkan dasar-dasar teoritis dan pemahaman yang kuat berkaitan dengan penelitian ini,

sehingga dapat menjadi landasan dan acuan perancangan desain pelaksanaan penelitian. Sumber literatur berasal dari jurnal penelitian, peraturan pemerintah, text book, disertai, website, proceeding, serta tugas akhir yang membahas tentang penyisihan kromium menggunakan *Azotobacter S8* maupun *Chlorella vulgaris*, laju pertumbuhan mikroorganisme, faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme, serta metode penyisihan logam berat yang terbaik.

### **3.2.3 Persiapan Penelitian**

Tahap persiapan penelitian dilakukan sebelum melaksanakan penelitian. Persiapan yang dilakukan meliputi tahapan untuk menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan saat penelitian serta analisis karakteristik awal mikroorganisme uji. Analisis karakteristik awal mikroorganisme uji dimulai dari re-growth bakteri dengan memindahkan bakteri dari media indukan ke media baru. Hal ini dilakukan untuk memperbanyak jumlah bakteri serta menjaga agar inokulat bakteri tidak mati selama proses penelitian berlangsung. Selain itu juga menyiapkan dan memperbanyak biakan mikroalga serta menguji laju pertumbuhannya. Kemudian dilakukan uji toleransi kedua mikroorganisme uji terhadap berbagai macam konsentrasi kromium untuk mendapatkan konsentrasi minimum yang dapat ditolerir dan menghambat pertumbuhannya. Tahap persiapan penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

#### **1. Pembuatan Media Nutrient Broth (NB)**

Pembuatan media Nutrient Broth (NB) digunakan sebagai media atau substrat bakteri yang dilakukan sesuai dengan kebutuhan. Media NB pada penelitian ini digunakan untuk re-growth bakteri pada media cair. Nantinya biakan akan digunakan pada uji penyisihan logam kromium yang akan dilakukan dengan konsorsium. Pembuatan media NB untuk 1 liter membutuhkan 8 gram bubuk NB (Merck, Jerman). Bubuk

NB yang telah ditimbang selanjutnya dicampur aquades (OneMed, Indonesia) dengan cara diaduk untuk melarutkan NB. Setelah itu media NB cair dituangkan kedalam Erlenmeyer (Pyrex, Jerman) sesuai kebutuhan dan disterilisasi. Media NB digunakan pada tahap penelitian utama.

## **2. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)**

Pembuatan media Nutrient Agar (NA) digunakan sebagai substrat atau media tumbuh bakteri pada peremajaan inokulat, uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC), dan perhitungan jumlah koloni bakteri. Pembuatan media NA untuk 1 liter membutuhkan 20 gram bubuk NA (Merck, Jerman). NA bubuk dilarutkan dengan aquades (OneMed, Indonesia) kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih. Selanjutnya NA yang telah larut dituangkan ke dalam tabung reaksi (Pyrex, Jerman) dan atau erlenmeyer (Pyrex, Jerman). Media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1,1 atm selama 2 jam.

Media di dalam tabung reaksi yang digunakan sebagai media miring membutuhkan sebanyak 5 ml NA setiap tabung reaksi. Setelah itu media NA cair dalam tabung reaksi diberi penutup kapas pada bagian mulut tabung agar terhindar dari kontaminan. Setelah disterilkan, kemudian media NA cair tersebut dimiringkan dengan menggunakan landasan balok kecil dan didiamkan hingga media miring tersebut menjadi padat. Media di dalam cawan petri digunakan sebagai media datar dan dibutuhkan sebanyak 10 ml NA setiap cawan petri. Penambahan media NA cair pada cawan petri dilakukan secara aseptik yakni berjarak maksimal 20 cm dari api bunsen.

## **3. Pembuatan Larutan Fisiologis**

Media fisiologis pada penelitian ini digunakan sebagai pencuci bakteri, pengencer pada saat trial and error absorbansi, serta pengencer pada uji total koloni bakteri.

Larutan fisiologis dibuat dengan cara melarutkan 8,5 gram NaCl (salinitas 0,85%) (SAP, Indonesia) dalam 1000 ml larutan aquadest. Setelah dilarutkan, air fisiologis diaduk hingga homogen dan dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave (ASC, Jerman) pada suhu 121°C selama  $\pm$  60 menit.

#### **4. Pembuatan Larutan Stok Kromium**

Pembuatan larutan stok kromium dilakukan dengan menimbang dan melarutkan bubuk Potassium dichromat atau  $K_2Cr_2O_7$  (Merck, Jerman) dengan konsentrasi yang telah ditentukan pada 1 liter air laut komersil dengan salinitas 30-35 ppt. Air laut yang digunakan dapat diperoleh dari pasar ikan hias. Larutan tersebut digunakan sebagai substrat yang akan disisihkan. Larutan stok kromium yang homogen kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama  $\pm$  60 menit.

#### **5. Sterilisasi Alat Uji dan Media**

Terdapat beberapa metode yang berbeda untuk melakukan sterilisasi alat dan media baik yang berupa gelas maupun non-gelas. Langkah awal yang dilakukan pada tahap ini adalah mencuci seluruh alat yang akan digunakan pada penelitian. Kemudian diangin-anginkan ataupun dapat diusap dengan tisu agar cepat kering. Untuk peralatan gelas, alat yang telah bersih dan kering selanjutnya dibungkus dengan kertas minyak dan direkatkan dengan karet. Hal ini bertujuan untuk menghindari masuknya uap air pada alat yang akan disterilisasi tersebut. Alat yang telah dibungkus selanjutnya dilakukan proses sterilisasi menggunakan autoclave (ASC, Jerman) dengan suhu 121°C selama  $\pm$  2 jam. Sedangkan untuk peralatan non gelas, alat yang akan disterilkan direndam ke dalam larutan kaporit dengan konsentrasi tertentu selama

minimal 30 menit. Setelah itu dibilas bersih dengan aquades dan dibiarkan hingga kering.

Bahan atau media yang akan digunakan pada penelitian ini juga akan disterilisasi. Media NA, NB, larutan stok, larutan fisiologis dan bahan lainnya yang akan digunakan saat penelitian disterilisasi dengan autoclave. Bahan dan media yang telah siap kemudian dimasukkan ke dalam autoclave dengan suhu 121°C selama  $\pm$  60 menit (Hossain, et.al, 2012). Proses sterilisasi alat uji dan media ini bertujuan untuk membebaskan media dari semua mikroorganisme atau kontaminan yang dapat mengganggu pada proses penelitian selanjutnya sehingga tercipta keadaan steril pada semua alat dan substrat sebelum digunakan.

## **6. Peremajaan Isolat Bakteri**

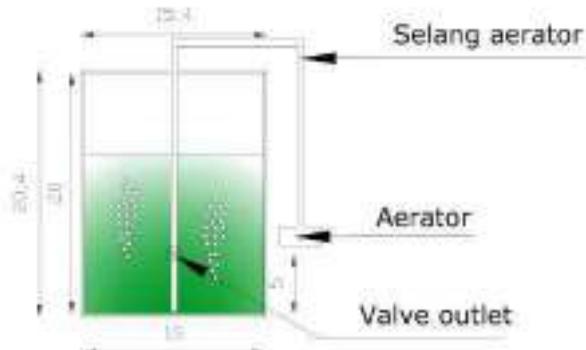
Memperbanyak indukan bakteri perlu dilakukan sebelum uji pertumbuhan bakteri dan uji penyisihan logam berat. Selain itu, peremajaan isolat bakteri bertujuan untuk menjaga indukan bakteri agar tidak terkontaminasi sehingga akan didapatkan cadangan biakan bakteri yang diperlukan apabila terjadi kesalahan maupun kebutuhan bakteri yang melebihi perkiraan. Jenis bakteri yang digunakan dalam penelitian adalah *Azotobacter* S8. Bakteri tersebut diinokulasikan dari media NA miring lama ke dalam media NA miring baru yang telah disterilisasi secara aseptik. Media NA miring yang telah diinokulasikan bakteri disimpan dan diinkubasi ke dalam inkubator (Memert, Jerman) pada suhu 37°C dengan waktu minimal 24 jam agar bakteri tersebut siap untuk digunakan dalam penelitian selanjutnya.

## **7. Propagasi Alga dan Uji Laju Pertumbuhan Mikroalga**

Sebelum dilakukan Range Finding Test pada penelitian pendahuluan, propagasi mikroalga perlu dilakukan untuk mendapatkan kondisi alga yang mencapai steady state.

Propagasi yang sering disebut sebagai kultivasi atau seeding bertujuan untuk mendapatkan mikroalga yang siap digunakan dalam pengoperasian reaktor. Metode yang dilakukan merujuk pada Anderson (2005) yang telah disesuaikan. Proses kultivasi dilakukan selama 1 minggu dengan penambahan nutrisi pupuk Walne dan vitamin (B12, thiamin, dan biotin) dengan konsentrasi masing-masing 1 mL/L dari volume total kultivat. Selain itu diberikan penyinaran menggunakan sinar matahari atau sinar artifisial dengan siklus terang/gelap adalah 12/12 dan intensitas cahaya 6000-7000 lux. Nutrien yang digunakan diperoleh dari BPBAP Situbondo. Sedangkan media tumbuh merupakan air laut komersil dengan salinitas awal 35 ppt yang telah disterilkan terlebih dahulu. Proses kultivasi harus dilakukan secara steril dan aseptik untuk mendapatkan biakan mikroalga murni tanpa ada mikroorganisme lain yang ikut berkembangbiak. Sebelum dilakukan propagasi, uji laju pertumbuhan mikroalga dilakukan terlebih dahulu dengan melakukan perhitungan jumlah sel mikroalga setiap 24 jam. Reaktor yang digunakan cukup dengan erlenmeyer 1 L, dan dilakukan prosedur yang sama dengan prosedur kultivasi. Perbedaannya adalah pada uji laju pertumbuhan mikroalga perlu dilakukan sampling pada reaktor setiap 24 jam sekali selama 7 hari dan dilakukan perhitungan jumlah sel mikroalga serta pengecekan nilai pH, suhu, salinitas, Optical Density (OD), serta nilai klorofil A sampel. Sedangkan pada kultivasi yang notabene merupakan langkah untuk memperbanyak stok induk, tidak perlu dilakukan sampling dan diakhiri sampai akhir fase eksponensial yang didapatkan dari hasil grafik uji laju pertumbuhan mikroalga. Perhitungan jumlah sel mikroalga dilakukan dengan menggunakan Haemocytometer Neubauer Improved (Brand, Jerman) di bawah mikroskop dengan perbesaran (objektif x okuler) sebesar 100x.

Reaktor propagasi yang digunakan adalah berupa erlenmeyer volume 1 L, 2L, dan juga akrilik bening dengan volume 3 L (panjang 15 cm, lebar 15 cm, dan tinggi 20 cm) steril dengan detail desain dapat dilihat pada Berikut ini merupakan gambar tampak depan reaktor propagasi :



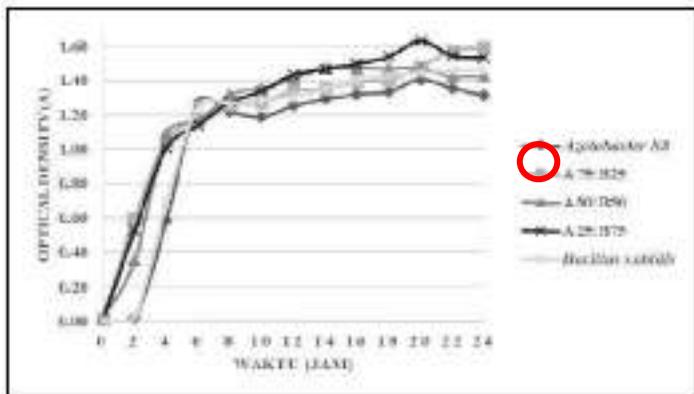
**Gambar 3. 2 Reaktor Propagasi**

## **8. Uji Laju Pertumbuhan Bakteri**

Uji laju pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui lama pertumbuhan bakteri serta memperoleh fase eksponensial yang akan digunakan sebagai penentu waktu kultivasi pada tahap uji penyisihan logam kromium. Uji laju pertumbuhan bakteri dilakukan pada media NB. Uji pertumbuhan bakteri ini dengan melakukan pengocokan selama 24 jam. Selama uji pertumbuhan bakteri dilakukan pengamatan Optical Density (OD). Pengambilan sampel analisis pengamatan dilakukan 2 jam sekali selama 24 jam kemudian diuji dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Pada penelitian ini, uji laju pertumbuhan bakteri tidak dilakukan kembali. Tetapi mengacu pada hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Imron dan Purwanti pada

tahun 2016. Peneliti tersebut menguji laju pertumbuhan bakteri *Azotobacter* S8 dengan metode yang sama. Hasil didapatkan bahwa bakteri *Azotobacter* S8 akan mencapai puncak fase eksponensial pada jam ke 6 dengan waktu aklimatisasi selama 2 jam. Berikut ini merupakan kurva laju pertumbuhan *Azotobacter* S8 yang digunakan pada penelitian ini.



**Gambar 3. 3 Grafik Laju Pertumbuhan Bakteri**

Sumber : Imron dan Purwanti, 2016

## 9. Uji Minimum Inhibitory Concentration dengan Metode Screening

MIC merupakan konsentrasi minimum inhibitor yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Aktifitas mikroorganisme terhadap logam kromium dapat dilihat dengan menentukan nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode screening dengan menggunakan media NA sebagai media pada cawan petri yang diberi pencemar kromium dengan salinitas akhir media berkisar antara 30-35 ppt. Konsentrasi

kromium yang digunakan untuk menentukan MIC adalah 0, 10, 25, 50, 100, dan 200 mg/L. Uji MIC dengan metode screening dapat dilihat pada Gambar 3.4.

Pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri dengan selang waktu 24 - 168 jam (7 hari) setelah inokulasi. Pertumbuhan bakteri pada media yang mengandung logam kromium dibandingkan dengan media kontrol yakni konsentrasi kromium 0 mg/L. Nilai MIC dilakukan dengan pengamatan visual maupun dengan perhitungan jumlah koloni yang terbentuk pada cawan petri. Cawan dengan konsentrasi kromium tertentu yang menunjukkan terhambatnya pertumbuhan bakteri selama waktu uji merupakan cawan dengan konsentrasi minimum yang menghambat pertumbuhan bakteri uji. Setelah diperoleh nilai MIC, dipilih satu konsentrasi tertentu dibawah nilai MIC yang disesuaikan dengan hasil Range Finding Test pada mikroalga sebagai konsentrasi yang digunakan pada tahap uji penyisihan logam kromium oleh konsorsium bakteri dan mikroalga. Konsentrasi yang terpilih tersebut merupakan konsentrasi maksimum yang toleran terhadap kedua mikroorganisme uji.



**Gambar 3. 4 Uji MIC dengan Metode Screening**

## **10. Range Finding Test**

Range Finding Test memiliki tujuan untuk mencari konsentrasi pencemar yang toleran terhadap mikroorganisme

uji (dalam hal ini mikroalga) sehingga dapat dikondisikan untuk tetap hidup dan melakukan treatment secara optimal. Range Finding Test dilakukan dengan menggunakan konsentrasi yang berbeda pada 5 rentang konsentrasi dalam reaktor untuk mengukur tingkat toksisitas air limbah kromium terhadap mikroalga *Chlorella vulgaris*. Berdasarkan USEPA Guidelines 850.5400, jumlah konsentrasi yang divariasikan harus berjumlah 5 konsentrasi dengan rentang variasi mengikuti deret geometri dengan rasio 1,5-2 serta disesuaikan dengan konsentrasi yang digunakan pada saat uji MIC pada bakteri.

Konsentrasi yang diuji adalah perbandingan antara konsentrasi limbah cair kromium sebesar 0, 10, 25, 50, 100, dan 200 mg/L dalam labu erlenmeyer 250 mL yang berlangsung selama 7 hari serta diagitasi dengan kecepatan 130 rpm. Namun jika dalam waktu 7 hari belum ditemukan mikroalga yang mati dari hari ke 0, maka range finding test dilanjutkan sampai batas waktu 14 hari. Hasil uji RFT selanjutnya dihubungkan dengan hasil uji MIC pada bakteri sehingga dapat dicari konsentrasi optimum pencemar yang mampu disisihkan oleh konsorsium bakteri dan mikroalga.

#### **3.2.4 Uji Penyisihan Logam Kromium dan Analisis Parameter**

Uji penyisihan logam kromium oleh konsorsium bakteri dan mikroalga merupakan tahap utama pada penelitian ini untuk menentukan persentase penyisihan kromium yang dilakukan oleh konsorsium serta menentukan komposisi konsorsium terbaik terhadap persen penyisihan logam kromium. Uji penyisihan logam kromium oleh konsorsium dilakukan dalam High Rate Algal Reactor dengan volume total media sebanyak 8 liter. Dilakukan penambahan nutrisi mikroalga berupa pupuk walne dan vitamin ke dalam reaktor dengan konsentrasi 1 mL/L total volume media. Bakteri pada penelitian ini tidak ditambahkan nutrisi dikarenakan sistem yang digunakan merupakan High Rate Algal Reactor yang

mana dalam skala lapangan merupakan reaktor khusus untuk mengembangbiakkan mikroalga. Sehingga fokus utama pada percobaan ini adalah mikroalga tanpa mengesampingkan peran bakteri yang digunakan. Media tumbuh yang digunakan adalah air laut komersil dengan salinitas awal 35 ppt yang dipaparkan pencemar kromium dari larutan stok  $K_2Cr_2O_7$  dengan konsentrasi sesuai hasil uji MIC dan uji RFT. Uji penyisihan dilakukan selama 7 hari.

Pada tahap ini, parameter yang akan dianalisis adalah pH, suhu, salinitas, konsentrasi total kromium, jumlah sel mikroalga dan jumlah koloni bakteri. Parameter jumlah koloni bakteri akan dianalisis pada hari ke-0, jam ke 4 (setengah fase eksponensial), jam ke 6 (fase eksponensial), hari ke-1, hari ke-4 dan hari ke-7. Jumlah sel mikroalga, pH, suhu, dan salinitas akan dianalisis setiap 24 jam selama 7 hari. Serta analisis konsentrasi total kromium akan dilakukan di awal dan di akhir percobaan. Berikut ini rincian parameter dan metode pengukuran yang akan digunakan :

- a. Pengukuran pH dan suhu dilakukan dengan pH meter (Cyberscan 510, USA) di Laboratorium Remediasi Lingkungan, Departemen Teknik Lingkungan, FTSLK, ITS.
- b. Pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan salinometer (OHaus Starter 3100C, USA) di Laboratorium Remediasi Lingkungan, Departemen Teknik Lingkungan, FTSLK, ITS.
- c. Penurunan konsentrasi kromium dapat dianalisis dengan Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) (Shimitzu 62016/17, Japan) di Laboratorium Penelitian dan Konsultasi Industri, Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI), Surabaya, Jawa Timur.
- d. Pengukuran jumlah koloni bakteri menggunakan metode pour plate.
- e. Pengukuran jumlah sel mikroalga dilakukan dengan menggunakan Haemocytometer Nebauer Improved (Brand,

Jerman) di bawah mikroskop dengan perbesaran (objektif x okuler) sebesar 100x.

Variabel yang digunakan pada penelitian ini yaitu variasi komposisi bakteri dan mikroalga serta variasi campuran antara konsorsium dan media pencemar dalam reaktor uji. Variabel penelitian yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1. berikut

**Tabel 3. 1 Variabel Perlakuan antara Komposisi Konsorsium dengan Variasi Komposisi Konsorsium Terhadap Media Pencemar dalam Reaktor Uji**

Persen Komposisi Mikroorganisme Uji (%)			Komposisi Konsorsium dalam Reaktor Uji (%)	
Azotobacter S8	Chlorella vulgaris	Kode	5% (A)	10% (B)
0	0	K0	Kontrol	
25	75	K1	K1A	K1B*)
50	50	K2	K2A	K2B
75	25	K3	K3A	K3B

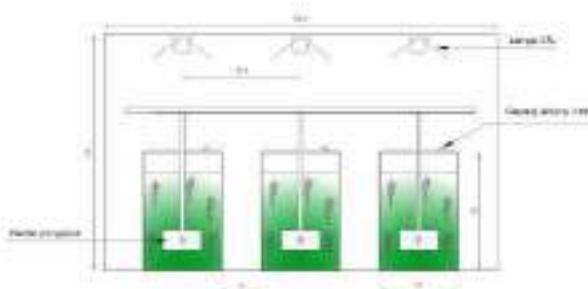
Keterangan :

- K = Komposisi mikroorganisme
- A = Komposisi konsorsium dalam reaktor uji 5% terhadap pencemar 95%
- B = Komposisi konsorsium dalam reaktor uji 10% terhadap pencemar 90%
- K0 = Tanpa adanya mikroorganisme (kontrol)
- K1 = 25% Azotobacter S8 dan 75% Chlorella vulgaris
- K2 = 50% Azotobacter S8 dan 50% Chlorella vulgaris
- K3 = 75% Azotobacter S8 dan 25% Chlorella vulgaris

\*) = Pada komposisi antara konsorsium dan pencemar 10% : 90% (dimana volume konsorsium 800 mL dan pencemar 7,2 L), yang dimaksud dengan 25% Azotobacter S8 adalah bakteri Azotobacter S8 pada kepadatan sel 10.000 sel/mL yang diatur melalui trial and error

absorbansi 0,5 A dan dilarutkan ke dalam air salin 0,85% sebanyak 200 mL. Sedangkan 75% *Chlorella vulgaris* adalah mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dipanen pada waktu setengah fase eksponensial sebanyak 600 mL. Keadaan ini berlaku juga untuk variasi lain dengan penyesuaian yang sama, misal 50% : 50% berarti volume bakteri sama dengan volume mikroalga yang ditambahkan yakni 400 mL (pada 10% konsorsium) dan atau 200 mL (pada 5% konsorsium).

Berdasarkan Tabel 3.1 maka kebutuhan reaktor pada penelitian ini sebanyak 7 reaktor. Reaktor yang digunakan adalah High Rate Algal Reactor (HRAR) secara batch dengan volume reaktor yang digunakan adalah  $\pm 12$  Liter dengan dimensi panjang 20 cm, lebar 20 cm, dan tinggi 30 cm. Reaktor dimodifikasi dengan ditutup dan disterilisasi untuk menghindari kontaminasi mikroorganisme lain yang tidak diinginkan selain *Azotobacter S8* dan *Chlorella vulgaris*. Pada reaktor HRAR ini dilakukan paparan cahaya dalam range waktu 12 jam. Intensitas cahaya yang digunakan berasal dari intensitas cahaya optimum menggunakan lampu fluorescent yang mendukung pertumbuhan mikroalga pada penelitian yang telah dilakukan oleh Triatmojo dan Tangahu pada tahun 2016 yakni 6000-7000 lux. Sedangkan untuk reaktor kontrol terdapat 1 reaktor, yaitu reaktor tanpa mikroorganisme uji. Penelitian ini dilakukan secara duplo. Berikut ini merupakan gambar tampak depan reaktor percobaan.



**Gambar 3. 5 Reaktor Uji Penyisihan Kromium**

### **3.2.5 Analisis Data dan Pembahasan**

Pada penelitian ini, analisis data dan pembahasan akan dilakukan setelah mendapatkan data dari hasil percobaan yang dilakukan. Hasil analisis yang diperoleh akan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik, serta dianalisis secara deskriptif. Kemudian dilakukan uji pengaruh variabel terhadap respon penurunan konsentrasi kromium menggunakan Analysis of Variance (ANOVA).

Sedangkan pembahasan hasil penelitian ini dilakukan berdasarkan tujuan awal penelitian, serta harus disesuaikan dengan studi literatur yang telah dilakukan. Literatur tersebut digunakan sebagai pendukung maupun pembanding hasil yang diperoleh. Output data yang akan dibahas adalah proses penyisihan kromium oleh konsorsium serta hubungan variabel komposisi konsorsium dan variasi campuran dalam reaktor terhadap tingkat removal logam kromium yang dihasilkan.

### **3.2.6 Kesimpulan dan Saran**

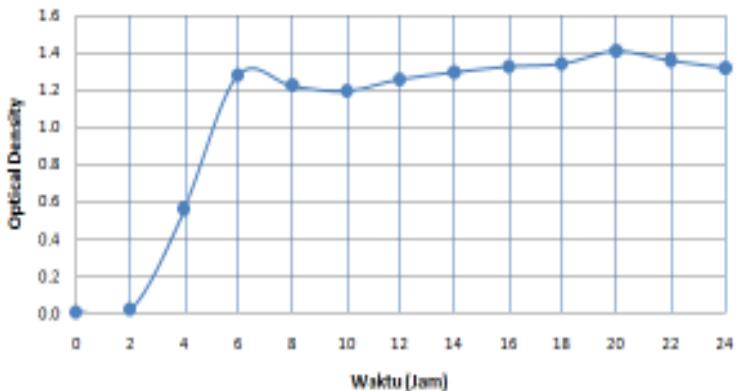
Kesimpulan dan saran pada penelitian ini akan ditarik setelah pelaksanaan penelitian berakhir. Kesimpulan yang ditarik merupakan jawaban dari tujuan, sedangkan saran yang diberikan merupakan masukan yang didasarkan pada kesimpulan tersebut.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

## BAB 4 PEMBAHASAN

### 4.1 Uji Laju Pertumbuhan Azotobacter S8

Uji laju pertumbuhan bakteri pada penelitian ini telah dilakukan oleh Imron dan Purwanti (2016) pada penelitian terdahulu. Fungsi dari uji laju pertumbuhan bakteri adalah untuk mengetahui sifat pertumbuhan bakteri yang digambarkan melalui kurva pertumbuhan. Adapun kurva pertumbuhan bakteri sendiri menggambarkan keempat fase pertumbuhan yakni fase lag, fase eksponensial, fase stasioner, hingga fase kematian (Dwipayana dan Ariesyady, 2010). Bakteri yang berada pada fase eksponensial nantinya akan digunakan sebagai inokulum awal pada penelitian utama. Berikut ini merupakan kurva pertumbuhan bakteri tunggal Azotobacter S8 dengan parameter Optical Density (OD).



**Gambar 4. 1 Kurva Laju Pertumbuhan Bakteri Azotobacter S8**

Sumber : Imron dan Purwanti, 2016

Dari kurva yang diperoleh dari hasil penelitian Imron dan Purwanti (2016) tersebut dapat diketahui bahwa bakteri Azotobacter S8 mengalami fase lag atau masa aklimatisasi

selama 2 jam pasca inokulasi. Kemudian mulai dari jam ke-2 hingga jam ke-6 bakteri mengalami fase eksponensial yang mana merupakan fase saat sel mikroorganisme berada pada keadaan stabil dan mampu membelah secara berganda (Hamdiyati, 2011). Hal tersebut ditunjukkan dari penambahan nilai absorbansi yang signifikan. Selanjutnya bakteri mengalami fase stasioner dimulai dari jam ke-6 hingga akhir masa uji. Bakteri pada setengah fase eksponensial akan dijadikan sebagai inokulum awal pada penelitian utama dengan melakukan uji trial and error absorbansi sebesar 0,5 A. Hal tersebut dilakukan untuk mendapatkan jumlah sel yang cukup dalam melakukan removal terhadap pencemar (Purwanti, et.al, 2015).

#### **4.2 Tahap Propagasi dan Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris***

Tahap propagasi atau yang biasa disebut dengan kultivasi dan atau seeding merupakan tahap yang dilakukan untuk memperbanyak stok biakan mikroalga yang diperlukan selama penelitian berlangsung. Pada dasarnya, tahap ini berbeda dengan uji laju pertumbuhan. Perbedaannya terletak pada waktu dan kebutuhan sampling yang dilakukan meskipun sebenarnya proses yang dilakukan adalah sama yakni mengkondisikan dan mengembangbiakkan mikroalga pada kondisi lingkungan yang optimum untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel mikroalga. Uji laju pertumbuhan perlu dilakukan pertama kali untuk mendapatkan kurva pertumbuhan sel yang nantinya akan digunakan sebagai penentu waktu panen pada tahap propagasi.

##### **4.2.1 Hasil Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris***

Uji laju pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui laju pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dikondisikan pada lingkungan tumbuh optimum. Luaran yang didapatkan dari uji ini adalah berupa kurva laju pertumbuhan yang dapat dibuat melalui perhitungan jumlah sel dan pengamatan secara fisik. Selama uji

laju pertumbuhan dilakukan, akan dianalisis fase-fase kehidupan mikroalga dimulai dari fase lag, fase logaritmik atau eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Nantinya, kurva yang diperoleh akan digunakan untuk menentukan umur waktu panen. Panen diperlukan untuk memperbanyak stok *Chlorella vulgaris*. Selain itu, kurva yang diperoleh dapat digunakan dalam menentukan waktu terbentuknya second generation yang sedang mengalami fase eksponensial untuk digunakan pada tahap uji Range Finding Test dan penelitian utama.

#### **4.2.1.1 Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Percobaan 1 dan Percobaan 2**

Pada tahap ini, peneliti beberapa kali melakukan pengulangan dikarenakan terjadi kesalahan akibat kurangnya pengetahuan terkait faktor-faktor yang diperlukan untuk mendapatkan kultur murni *Chlorella vulgaris*. Beberapa kesalahan diantaranya berasal dari nutrient yang digunakan, kondisi salinitas media tumbuh, serta proses yang seharusnya dilakukan secara aseptik dan steril. Peneliti pada awalnya melakukan uji laju pertumbuhan menggunakan sumber nutrisi berupa gula, pupuk urea, dan pupuk TSP yang telah dianalisis kandungan C : N : P -nya dan disesuaikan penambahannya kedalam media sesuai dengan Redfield Ratio yakni 106 : 16 : 1 (Redfield, 1934;1958). Kondisi media memiliki salinitas 0 ppt, menggunakan reaktor propagasi berbahan dasar akrilik bening dengan volume total 3,5 liter, perbandingan inokulum dan media sebesar 30 : 70 (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995 ; Kawaroe et.al., 2010) pencahayaan menggunakan lampu fluorescent 18 watt dengan intensitas 6000-7000 lux (Triatmojo dan Tangahu, 2017) dan rasio gelap : terang 12/12 (Maligan, dkk, 2015), aerasi menggunakan aerator dengan rasio hidup : mati 12/12 (Afifah, 2013), serta dilakukan tidak aseptik dan tidak steril. Hasil yang diperoleh pada uji coba laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* ke- 1

adalah kultur menjadi berbuih, keruh, dan berbau dihari ke-2 setelah inokulasi dilakukan.

**Tabel 4. 1 Hasil Pengamatan Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Percobaan ke-1**

Hari ke-	0	1	2
Hasil Pengamatan			



(a)



(b)

**Gambar 4. 2 Kondisi lingkungan uji coba laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* ke-1 (a) Penempatan reaktor propagasi (b) Pengaturan intensitas cahaya menggunakan lux meter HS1010**

Menurut Wiriosaputro (2002), timbulnya buih dan media yang berbau merupakan salah satu indikator yang menunjukkan bahwa kultur telah memasuki fase kematian. Fase kematian terjadi akibat perubahan kualitas air yang semakin buruk dan atau metabolisme mikroalga yang semakin menurun. Selain itu, hal ini dapat disebabkan oleh kondisi perlakuan awal media dan alat yang tidak steril, proses yang tidak aseptik, dan media yang tidak memiliki salinitas (salinitas 0 ppt). Oleh karena itu, peneliti menghentikan uji coba pertama dan melakukan uji coba laju pertumbuhan kedua dengan kondisi yang dibuat berbeda.

Gagalnya uji coba pertama menjadi dasar perubahan kondisi perlakuan pada uji coba kedua. Uji coba ke-2 laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dilakukan dengan kondisi media memiliki salinitas 33 ppt yang dibuat dengan melarutkan 33 gram bubuk NaCl ke dalam 1 liter aquades. Selain itu juga reaktor diubah ke skala yang lebih kecil yakni berupa Erlenmeyer ukuran volume 1 liter yang disumbat kapas lemak, perbandingan inokulum dan media sebesar 30 : 70, pencahayaan menggunakan lampu fluorescent 18 watt dengan intensitas 6000-7000 lux, rasio gelap : terang 12/12, aerasi menggunakan aerator dengan rasio hidup : mati 12/12, serta dilakukan secara aseptik dan seluruh bahan dan alat disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1,1 atm selama  $\pm$  2 jam. Penambahan nutrisi serupa dengan uji coba pertama yakni berupa gula, pupuk urea, dan pupuk TSP yang telah dianalisis kandungan C : N : P -nya dan disesuaikan penambahannya ke dalam media sesuai dengan Redfield Ratio yakni 106 : 16 : 1 (Redfield, 1934;1958). Inokulasi inokulum ke dalam media dilakukan di dalam laminar air flow. Hasil menunjukkan bahwa pada hari kedua pasca inokulasi mulai timbul buih dan keruh sedangkan pada hari ketiga, kultur kembali menunjukkan kondisi fisik berbuih lebih banyak, lebih keruh, dan berbau.

**Tabel 4. 2 Hasil Pengamatan Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Percobaan ke-2**

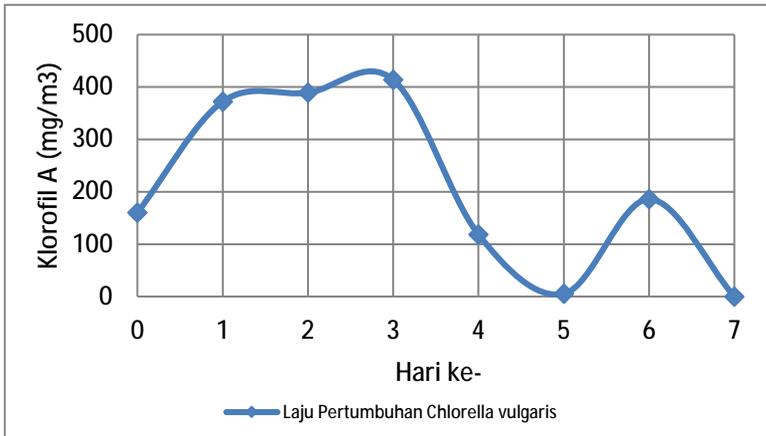
Hari ke-	0	1	2	3
Hasil Pengamatan				

Kondisi fisik yang memiliki kesamaan dengan hasil percobaan uji laju pertumbuhan pertama mengindikasikan bahwa mikroalga telah mati pada hari ketiga. Kekurangan nutrient diduga menjadi dasar kematian mikroalga tersebut. Selain itu, penggunaan sumber karbon berupa gula kurang tepat Karena menurut Richmond (1986) dan Loehr (1974) sumber karbon utama dari mikroalga adalah  $\text{CO}_2$  yang mana mikroalga mendapatkan  $\text{CO}_2$  melalui absorpsi dari udara, hasil respirasi organisme, dan alkalinitas senyawa bikarbonat dengan kata lain adalah karbon anorganik. Fase kematian yang terjadi menunjukkan bahwa jumlah nutrient yang terkandung dalam media sudah tidak cukup untuk memenuhi kebutuhan metabolisme mikroalga tersebut.

Oleh karenanya, pada hari ketiga, peneliti mencoba memberikan penambahan nutrient sesuai dengan nutrient yang digunakan pada awal inokulasi inokulum pada media. Percobaan dilanjutkan hingga 7 hari. Hasil menunjukkan tidak ada perubahan warna dan sifat fisik pada media kultur yakni putih kehijauan, keruh dan berbuih. Adapun penyebab tidak berkembangnya sel mikroalga (yang dalam hal ini seharusnya media kultur berwarna semakin kehijauan) dikarenakan sumber karbon yang digunakan merupakan karbon organik yang mana karbon organik merupakan sumber nutrisi bagi

perkembangbiakan dan metabolisme bakteri. Oleh karenanya dapat dipastikan kultur terkontaminasi dan mikroorganisme yang berkembang di dalam media adalah bakteri bukan mikroalga *Chlorella vulgaris* yang diinginkan.

Pada percobaan uji laju pertumbuhan kedua ini, peneliti melakukan uji klorofil setiap 24 jam terhadap sampel selama 7 hari tersebut. Uji klorofil dilakukan untuk mendapatkan kurva laju pertumbuhan serta klarifikasi kondisi fisik sampel. Hasil uji klorofil menunjukkan pada hari ketiga memiliki nilai tertinggi dan menurun drastis hingga hari ke 5. Hasil uji klorofil ditunjukkan oleh kurva berikut ini.



**Gambar 4. 3 Grafik Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Berdasarkan Nilai Klorofil A pada Percobaan Kedua**

Berdasarkan grafik tersebut diketahui pada hari ke- 3 nilai klorofil kultur *Chlorella vulgaris* pada percobaan kedua menunjukkan nilai yang tertinggi yakni sebesar 413,85 mg/m<sup>3</sup> setelah sebelumnya pada hari ke- 1 dan ke- 2 memiliki nilai sebesar 372,02 mg/m<sup>3</sup> dan 388,93 mg/m<sup>3</sup>. Jika dilihat dari grafik tersebut dapat diketahui bahwa pada hari ke-0 hingga ke-3 kultur

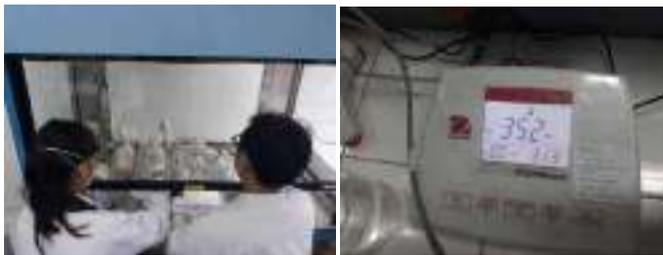
mengalami fase eksponensial. Namun, secara fisik perubahan warna kultur sangat bertolak belakang dengan hasil uji klorofil sesuai dengan Gambar 4.2 sebelumnya. Hingga hari ke-7 proses propagasi, warna kultur semakin keruh dan pekat meskipun telah ditambahkan nutrient pada hari ke-3. Oleh karena hal tersebut, peneliti melakukan uji laju pertumbuhan mikroalga kembali dengan perlakuan yang berbeda dari percobaan 1 dan 2. Hal tersebut dilakukan karena hasil percobaan ke-2 dianggap gagal.

#### **4.2.1.1 Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Percobaan 3**

Pada percobaan uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* yang ketiga, peneliti mengubah beberapa perlakuan. Dari hasil studi literatur dan informasi yang didapatkan dari BPBAP Situbondo selaku penyedia inokulum awal, diketahui bahwa sebenarnya terdapat 3 jenis skala budidaya mikroalga *Chlorella vulgaris* yang teknik dan metodenya telah digunakan secara luas. Dari ketiga skala budidaya tersebut masing-masing menggunakan nutrient dan perlakuan yang berbeda. Sesuai dengan Walne PR (1970) dalam Culture Collection of Algae and Protozoa (2002), nutrient atau pupuk yang digunakan terdiri dari 2 jenis yakni pupuk PA (Pro Analisis) dan Pupuk Teknis dengan konsentrasi berbeda pada masing-masing skala kultur. Berangkat dari literatur yang telah dijelaskan pada bab 2, peneliti melakukan uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* percobaan ketiga menggunakan prosedur kultur untuk skala laboratorium.

Uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dimulai dengan melakukan sterilisasi media dan alat berupa filtrat air laut komersil yang dijual di pasaran dengan salinitas awal sebesar 35,2 ppt yang diuji menggunakan alat salinometer. Wadah kultur menggunakan erlenmeyer 1-2 liter yang disterilisasi terlebih dahulu bersama media menggunakan autoclave 121°C, 1,1 atm. Pada percobaan ketiga ini, peneliti melakukan variasi penambahan inokulum ke dalam media yaitu inokulum dicampurkan dengan perbandingan inokulum : media air laut

sebesar 30 : 70, 20 : 70, dan 10 : 90 untuk mendapatkan nilai inokulum optimum. Kemudian ditambahkan pupuk Pro Analisis berupa pupuk Walne dan Vitamin (B12, B1, dan Biotin) sebanyak 1 mL/L media kultur. Seluruh kegiatan dilakukan secara aseptik dan steril. Kultur dikultivasi dengan penambahan aerasi menggunakan aerator selama 24 jam dan diberi pencahayaan menggunakan sinar artificial dengan rasio gelap : terang 12/12 (Maligan, dkk, 2015).



(a)

(b)

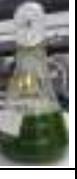
**Gambar 4. 4 (a) Proses inokulasi saat propagasi dilakukan secara aseptik dan steril pada Laminar Air Flow (b) Hasil uji salinitas air laut komersil yang digunakan sebagai media kultur**

Uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* pada percobaan ketiga dilakukan selama 10 hari dengan melakukan analisis parameter setiap 24 jam. Parameter yang diamati adalah suhu, pH, salinitas, nilai Optical Density, Klorofil A, dan jumlah sel *Chlorella vulgaris*. Hasil pengamatan fisik selama 10 hari pada proses kultivasi/propagasi dengan 3 variasi rasio penambahan inokulum yang berbeda dapat dilihat pada tabel 4.3 pada halaman berikutnya.

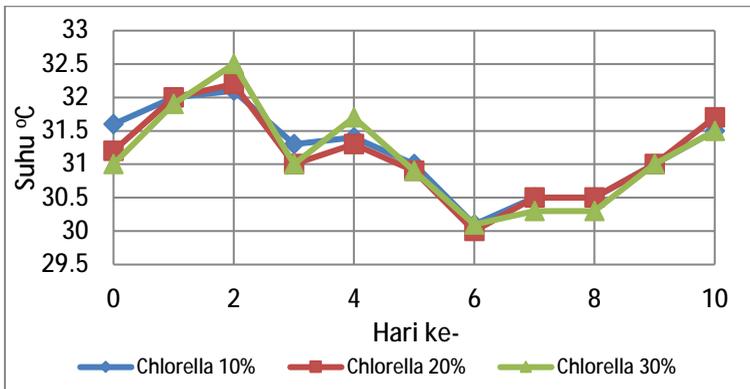
#### **a. Suhu**

Suhu merupakan suatu energi kinetik yang timbul dari sumber cahaya yang masuk dan menembus ke dalam air. Suhu merupakan salah satu faktor penting bagi pertumbuhan *Chlorella*

**Tabel 4. 3 Hasil Pengamatan Fisik Uji Laju Pertumbuhan Chlorella vulgaris**

Perbandingan Inokulum : Media	Hari ke-										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10 : 90											
20 : 80											
30 : 70											

vulgaris terutama pada skala laboratorium. Hal tersebut dikarenakan suhu dapat mempengaruhi aktivitas metabolisme sel baik secara fisika, kimia, maupun biologi. Pada suhu optimum, sel dapat berkembang biak dengan baik. Peningkatan dan penurunan suhu hingga batas tertentu akan merangsang adanya aktifitas molekul, meningkat dan menurunnya laju difusi dan juga laju fotosintesis (Sachlan 1982). Berikut ini merupakan grafik suhu hasil uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dengan berbagai variasi rasio inokulum dan media.



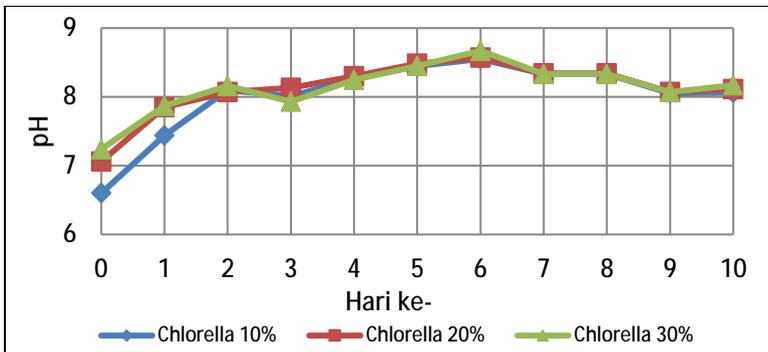
**Gambar 4. 5 Grafik Suhu Media Kultur Pada Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris***

Menurut Tjahjo, et.al. pada tahun 2002, suhu optimum pertumbuhan *Chlorella vulgaris* adalah berkisar antara 25 – 34°C dan atau 25 – 30°C (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Suhu di bawah 16°C dapat menyebabkan kecepatan perkembangbiakan *Chlorella vulgaris* turun, sedangkan suhu diatas 36°C dapat menyebabkan kematian (Taw 1990). Hasil pengukuran parameter suhu pada gambar 4.5 menunjukkan bahwa perubahan nilai suhu pada media kultur tidak terlalu signifikan. Rata-rata suhu yang dihasilkan oleh media kultur selama 10 hari masa uji adalah 31,1-

31,2°C. Angka tersebut masih dalam kisaran suhu optimum bagi proses pertumbuhan dan perkembangan *Chlorella vulgaris*.

## b. pH

Nilai pH pada media kultur merupakan faktor pengontrol mikroalga dalam memanfaatkan unsur hara. Nilai pH yang terlalu tinggi dapat mengurangi aktifitas fotosintesis fitoplankton (De La Noue dan De Pauw, 1988). Secara umum kisaran pH yang optimum untuk kultur *Chlorella* adalah antara 7-9. Menurut Nielsen (1955) dalam Prihantini, et.al. (2005) menyatakan bahwa pH yang sesuai untuk perkembangbiakan *Chlorella* berkisar antara 4,5-9,3 sedangkan kisaran optimum untuk *Chlorella* laut (*Chlorella vulgaris*) berkisar antara 7,8-8,5. Berikut ini merupakan grafik hasil pengukuran nilai pH pada uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* setiap 24 jam selama 10 hari masa uji.



**Gambar 4. 6 Grafik pH Media Kultur Pada Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris***

Berdasarkan grafik tersebut, rata-rata nilai pH media kultur untuk seluruh variasi berkisar antara 8,02-8,13. Nilai pH untuk 3 jenis variasi memiliki tren yang meningkat hingga akhir masa uji. Menurut Prihantini, et.al. (2005) hal tersebut kemungkinan terjadi karena adanya aktivitas fotosintesis mikroalga yang mana pada

saat terjadi fotosintesis, mikroalga akan memanfaatkan senyawa CO<sub>2</sub> bebas dan terlarut sebagai sumber karbon anorganik utama yang digunakan. Selain itu, mikroalga juga dapat menggunakan ion karbonat (CO<sup>3-</sup>) dan bikarbonat (HCO<sup>3-</sup>) sebagai sumber karbon yang digunakan untuk proses fotosintesis (Goldman dan Horne, 1983). Adanya penyerapan CO<sub>2</sub> dan ion karbonat/bikarbonat inilah yang menyebabkan penurunan nilai konsentrasi CO<sub>2</sub> terlarut dalam media dan mengakibatkan peningkatan nilai pH media (Sze, 1993).

Selain itu, peningkatan nilai pH juga dapat terjadi akibat adanya penguraian protein dan persenyawaan nitrogen lain. Menurut Darley (1982) dalam Prihantini, et.al. (2005), ammonium (NH<sup>4+</sup>), nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), dan nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) merupakan bentuk senyawaan nitrogen organik yang telah mengalami penguraian. Amonium sendiri dihasilkan melalui reaksi disosiasi ammonium hidroksida yang mana merupakan ammonia terlarut dalam air. Menurut Goldman dan Horne pada tahun 1983, reaksi yang dapat terjadi adalah

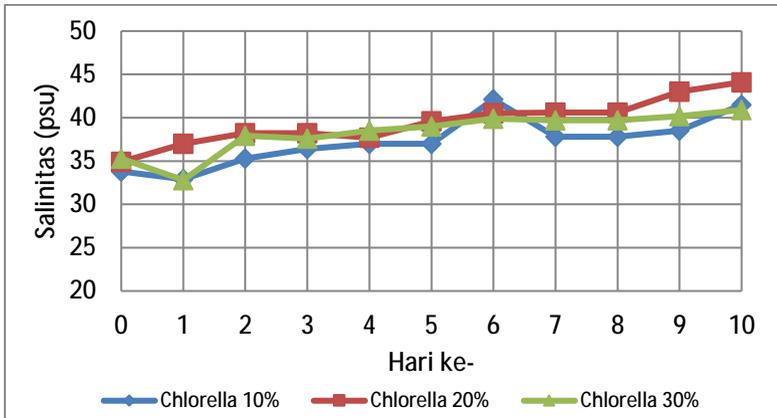


Bila kesetimbangan reaksi bergerak ke kanan, maka konsentrasi ammonium di dalam media kultur akan meningkat yang menyebabkan nilai pH media meningkat akibat disosiasi senyawa ammonium hidroksida menjadi ion hidroksil yang bersifat basa.

### **c. Salinitas**

Salinitas juga merupakan salah satu faktor penting bagi pertumbuhan mikroalga terutama *Chlorella vulgaris* sebagai mikroalga laut. Nilai salinitas optimum diperlukan untuk menjaga ketahanan membran sel agar tidak cepat lisis (Prabowo, 2009). Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty pada tahun 1995, *Chlorella vulgaris* tumbuh optimal pada salinitas 25 – 30 ppt sementara

pada salinitas 15 ppt tumbuh lambat dan tidak tumbuh pada salinitas 0 ppt dan 60 ppt. Berikut ini merupakan grafik hasil pengukuran salinitas media kultur menggunakan alat salinometer pada uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* setiap 24 jam selama 10 hari masa uji.



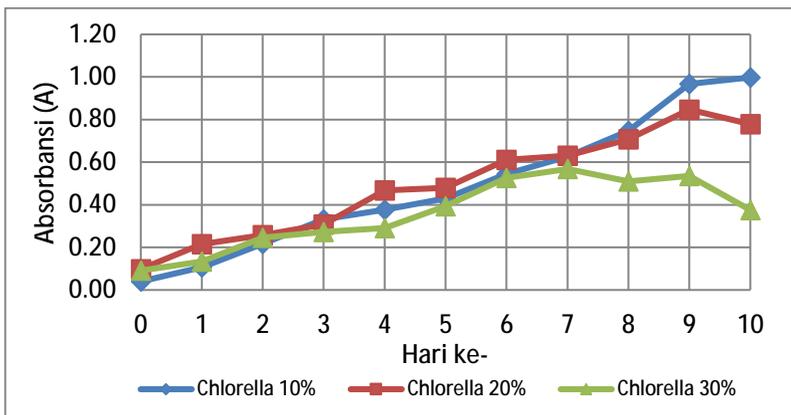
**Gambar 4. 7 Grafik Nilai Salinitas Media Kultur Pada Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris***

Dari grafik tersebut, diketahui bahwa salinitas media kultur mengalami kenaikan setiap harinya. Rata-rata nilai salinitas media kultur untuk ketiga jenis variasi berada pada kisaran 37,28-39,48 psu. Angka tersebut dapat dikatakan cukup tinggi dari range salinitas optimum. Menurut Prabowo pada tahun 2009, kenaikan angka salinitas dapat disebabkan oleh adanya kenaikan temperature yang relatif lebih tinggi. Penguapan air laut yang merupakan media kultur dapat dipercepat oleh gerakan gelembung aerasi dalam wadah kultur. Selain karena faktor penguapan, salinitas dapat meningkat karena adanya perbedaan input nutrient ke dalam sel. Kenaikan temperatur menyebabkan mikroalga susah beradaptasi terhadap lingkungan barunya sehingga pemanfaatan nutrient dalam media tidak dapat terjadi

dan yang terjadi hanya pembentukan senyawa garam dalam medium pertumbuhan seperti  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Hladka, 1971). Rostini (2007) juga mengatakan bahwa kenaikan salinitas pada media kultur dapat diakibatkan oleh adanya garam-garam metabolit hasil metabolisme sel ataupun pengendapan garam dan nutrient di dalam media kultur. Namun, pada dasarnya kenaikan salinitas juga membawa dampak baik bagi proses kultur karena menurut penelitian-penelitian terdahulu salinitas yang lebih tinggi dapat meningkatkan kondisi stress pada mikroalga sehingga mampu menghasilkan zat-zat tertentu dalam kuantitas yang lebih besar serta lebih cepat (Takagi, et.al, 2006 ; Bosma dan Wijffels, 2003).

#### d. Optical Density (OD)

Pada uji laju pertumbuhan ini juga dilakukan pengukuran nilai optical density. Pengukuran nilai OD dilakukan menggunakan spectrophotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600 nm (Kusuma dan Zulaika, 2014). Berikut ini merupakan nilai OD pada uji laju pertumbuhan yang dilakukan.



**Gambar 4. 8 Grafik Nilai Optical Density Pada Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris***

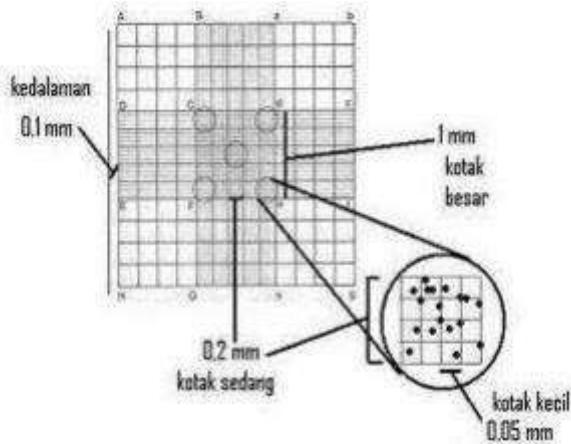
Nilai OD pada dasarnya dapat menunjukkan total jumlah sel mikroalga serta laju pertumbuhan sel. Namun dalam pengukuran OD, jumlah sel mikroalga yang nantinya akan diketahui merupakan jumlah total sel hidup dan sel mati yang tidak dapat dibedakan tanpa menggunakan mikroskop. Oleh karenanya, hasil pembacaan nilai OD pada grafik tersebut selalu meningkat hingga hari terakhir dikarenakan jumlah biomassa *Chlorella vulgaris* semakin banyak yang terbentuk (Widayat dan Hadiyanto, 2015). Pada uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* ini nilai OD nantinya akan diregresikan terhadap angka jumlah sel hidup dan klorofil A. Sehingga akan didapatkan metode yang tepat untuk menentukan jumlah sel yang akurat.

#### **e. Jumlah Sel *Chlorella vulgaris***

Perhitungan jumlah sel *Chlorella vulgaris* dilakukan untuk mengetahui jumlah sel yang hidup di dalam media kultur. Hasil perhitungan ini nantinya akan diregresikan dengan hasil nilai OD. Perhitungan jumlah sel dilakukan setiap 24 jam selama masa uji dengan menggunakan alat Haemocytometer Nebauer Improved di bawah mikroskop cahaya perbesaran 100x (10x lensa objektif x 10x lensa okuler) dan atau 400x (40x lensa objektif x 10x lensa okuler). Haemocytometer dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alkohol 95% kemudian + 1 mL kultur mikroalga *Chlorella vulgaris* diteteskan di atas bidang yang berisi kamar-kamar baca. Setelah itu ditutup dengan kaca penutup/deck glass. Penutupan harus secara hati-hati agar tidak terdapat gelembung air di bawah gelas penutup (Isnansetyo dan Kurniasuty, 1995). Berikut ini merupakan contoh alat yang digunakan serta kamar baca yang terlihat pada mikroskop.

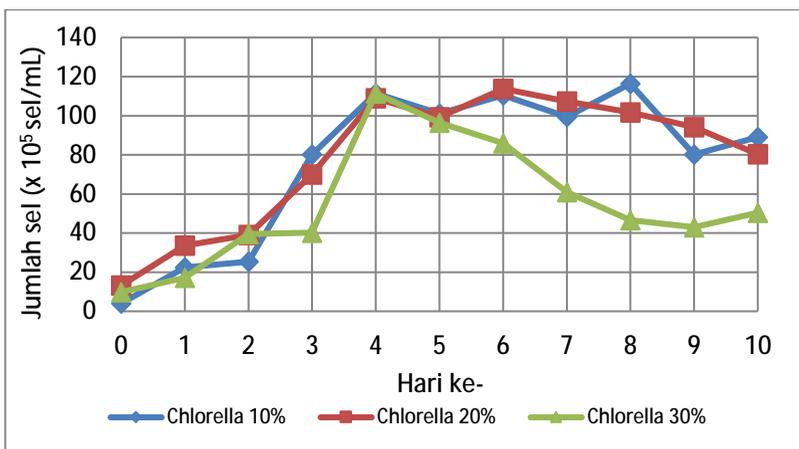


**Gambar 4. 9 Haemocytometer Nebauer Improved**



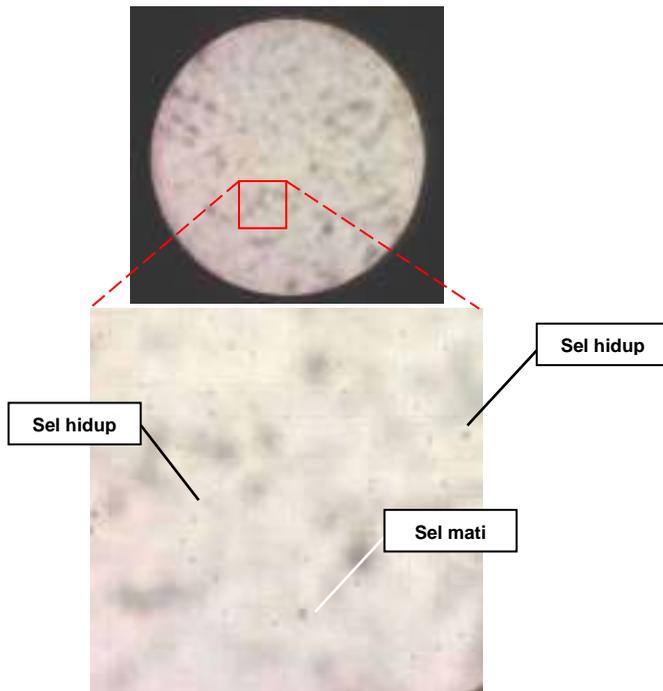
**Gambar 4. 10 Kamar – Kamar Baca Yang Terlihat Pada Mikroskop**  
 Sumber : Kusuma dan Zulaika, 2014

Hasil perhitungan jumlah sel menggunakan Haemocytometer dapat dilihat pada gambar berikut.



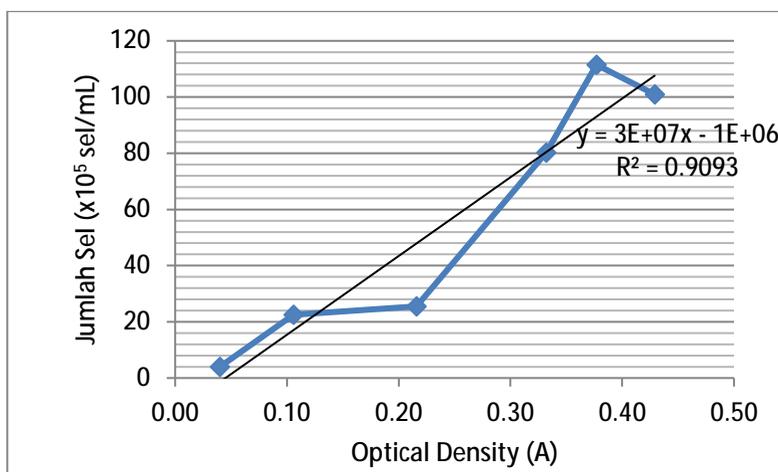
**Gambar 4. 11 Grafik Jumlah Sel Chlorella vulgaris Pada Uji Laju Pertumbuhan**

Pada grafik tersebut dapat terlihat bahwa jumlah sel hidup pada ketiga jenis variasi mengalami peningkatan mulai dari hari ke-0 hingga hari ke-4. Dan mengalami fase stasioner di atas hari ke-4. Pada grafik tersebut diketahui kultur tidak mengalami fase lag / aklimatisasi pada awal pertumbuhan. Dari grafik tersebut juga tidak terlalu terlihat adanya fase kematian karena tidak adanya perubahan jumlah sel yang terlalu signifikan. Beberapa penelitian terdahulu menyebutkan bahwa fase kematian terjadi pada media kultur di atas hari ke-14. Pembacaan jumlah sel pada penelitian ini difokuskan pada jumlah sel hidup saja. Hal ini dikarenakan pada proses pembacaan, jumlah sel mati tidak terlalu banyak akibat belum masuknya fase kematian.



**Gambar 4. 12 Perbedaan Sel Mati dan Sel Hidup Yang Terlihat Pada Mikroskop**

Jumlah sel tertinggi dari ketiga variasi inokulum berada pada hari ke-4 yang merupakan titik akhir fase eksponensial. Untuk penambahan inokulum 10%, jumlah sel hidup yang terhitung sebanyak  $111,5 \times 10^5$  sel/mL. Sedangkan untuk penambahan inokulum 20% dan 30% terhitung sebanyak  $109 \times 10^5$  sel/mL dan  $111,4 \times 10^5$  sel/mL. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa penambahan inokulum terbaik berada pada variasi 10% inokulum : 90% media. Begitupula pada hasil regresi nilai jumlah sel terhadap optical density memiliki nilai  $R = 0,909$  atau mendekati 1.



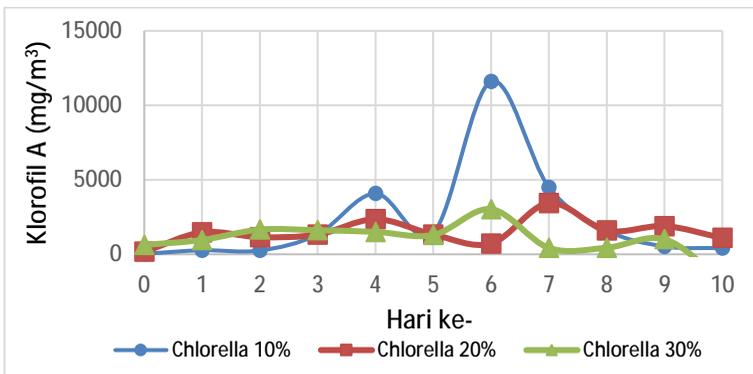
**Gambar 4. 13 Hubungan Nilai Jumlah Sel Terhadap Optical Density pada Variasi Inokulum Chlorella 10%**

Namun, jika dilihat dari setengah fase eksponensial, jumlah inokulum terbaik terletak pada variasi penambahan inokulum 20% dan 30% yakni  $39,04 \times 10^5$  sel/mL dan  $39,58 \times 10^5$  sel/mL. Tetapi setelah hari ke-4 yang merupakan akhir fase eksponensial, penurunan jumlah sel pada penambahan inokulum 30% menurun secara signifikan. Oleh karena itu pada proses propagasi/kultivasi selanjutnya, jumlah inokulum yang digunakan adalah 20% karena

memiliki rate pertumbuhan dan jumlah sel terbaik dari kedua variasi lainnya.

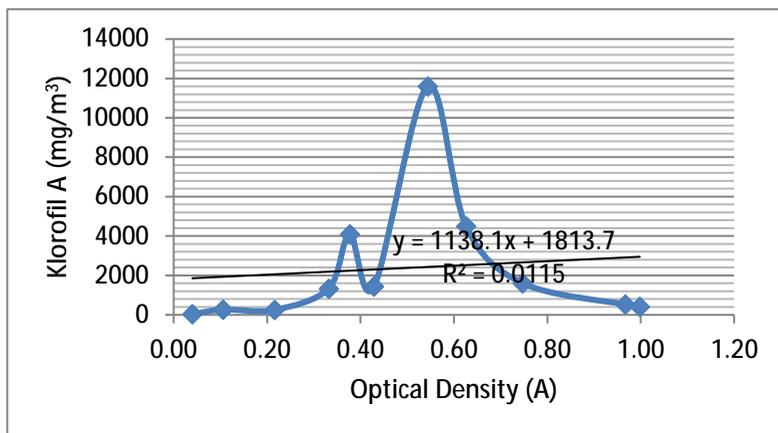
#### f. Klorofil A

Klorofil merupakan salah satu aspek penting pada pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroalga. Hal ini karena fitoplankton/mikroalga terutama *Chlorella vulgaris* merupakan mikroorganisme fotoautotrof yang mana dapat mengolah kebutuhan makanannya sendiri. Perubahan warna pada proses propagasi *Chlorella vulgaris* terjadi karena dominasi pigmen klorofil yang berwarna hijau pada selnya (Borowitzka, 1988). Ada berbagai macam jenis klorofil yang dikenal hingga saat ini yaitu klorofil a, klorofil b, klorofil c, klorofil d, disamping itu juga terdapat beberapa jenis pigmen lainnya seperti karoten dan xanthofil. Dari berbagai jenis pigmen tersebut, klorofil a yang paling sering ditemukan dalam fitoplankton, oleh karena itu konsentrasi fitoplankton sering dinyatakan dalam konsentrasi klorofil a (Parson, et.al, 1984 dalam Tadjudda, 2005). Berikut ini merupakan hasil pengukuran klorofil a pada media kultur yang dilakukan setiap 24 jam selama masa uji laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris*.



**Gambar 4. 14 Grafik Klorofil A Pada Uji Laju Pertumbuhan *Chlorella vulgaris***

Pada penelitian ini, uji klorofil A dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan pelarut organik aseton. Hasil ekstraksi dibaca pada panjang gelombang 664, 665, dan 750 nm yang kemudian dihitung menggunakan rumus Lorenzen (1967). Dari hasil uji klorofil a, ternyata didapatkan hasil yang tidak menunjukkan trend sesuai dengan kurva pertumbuhan *Chlorella vulgaris*. Pada inokulum 10% dan 30% nilai klorofil A tertinggi terjadi pada hari ke- 6 sebesar 11.606,49 mg/m<sup>3</sup> dan 3.027,78 mg/m<sup>3</sup>. Sedangkan pada inokulum 20% nilai klorofil A tertinggi terjadi pada hari ke- 7 sebesar 3.444,3 mg/m<sup>3</sup>. Padahal jika dikaitkan dengan jumlah sel hidup, ketiganya tidak berada pada hari ke-4 yang merupakan akhir fase eksponensial dan yang seharusnya memiliki nilai klorofil A tertinggi. Begitupula dengan hasil regresi terhadap nilai OD yang dicontohkan untuk variasi *Chlorella* 10% pada gambar berikut ini memiliki nilai R = 0,011 atau tidak mendekati 1 yang berarti klorofil A tidak memiliki hubungan dan pengaruh terhadap jumlah sel.



**Gambar 4. 15 Grafik Hubungan Nilai Klorofil A Dengan Optical Density**

Berdasarkan hasil studi literatur diketahui bahwa salah satu kelemahan pengukuran klorofil dengan metode spektrofotometri adalah karena klorofil dan hasil dekomposisinya masih sangat sulit dibedakan, keduanya menyerap cahaya pada spektrum merah. Menurut Riyono pada tahun 2006, apabila hasil-hasil dekomposisi klorofil yang oleh Yentsch dan Menzel (1963) disebut sebagai phaeophytin group, merupakan komponen yang besar maka dengan sendirinya hasil pengukuran klorofil akan lebih tinggi dari yang sebenarnya. Klorofil A dalam hal ini sangat mudah berubah menjadi phaeophytin dengan menambahkan asam lemah, misalnya dengan HCl 1 N, akibatnya sampel klorofil tersebut penyerapannya akan berkurang, sedangkan phaeophytin tidak mengalami pengurangan penyerapan. Berkurangnya penyerapan ini disebabkan lepasnya ikatan klorofil dengan atom Mg, sedangkan atom Mg bereaksi dengan HCl menjadi  $MgCl_2$ .

Berdasarkan hasil tersebut, maka untuk penelitian utama, uji klorofil A (yang ditunjukkan pada gambar 4.3 dan 4.14) tidak digunakan sebagai penentu laju pertumbuhan sel mikroalga *Chlorella vulgaris* melainkan menggunakan perhitungan jumlah sel menggunakan Hemocytometer Nebauer Improved. Hal tersebut dilakukan untuk mengurangi tingkat kesalahan pada penentuan laju pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dalam reaktor konsorsium.

#### **4.1 Penentuan Konsentrasi Chromium yang Menghambat dan Toleran terhadap Azotobacter S8 dan Chlorella vulgaris**

Nilai konsentrasi Hexavalent Chromium pada penelitian ini perlu ditentukan terlebih dahulu. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui nilai konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan kedua jenis mikroorganisme yang digunakan dalam konsorsium. Adapun masing-masing mikroorganisme yang pada penelitian ini digunakan mikroalga *Chlorella vulgaris* dan bakteri *Azotobacter S8*, memiliki metode masing-masing. Untuk bakteri

Azotobacter S8 dilakukan uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) sedangkan untuk mikroalga *Chlorella vulgaris* digunakan metode Range Finding Test (RFT). Keduanya menggunakan range konsentrasi yang sama yakni 0 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, dan 200 mg/L.

Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat larutan stok kromium yang berasal dari serbuk  $K_2Cr_2O_7$ . Larutan stok yang dibuat pada penelitian ini secara teori adalah sebesar 2000 mg/L. Bubuk  $K_2Cr_2O_7$  ditimbang sesuai dengan perhitungan yang terdapat pada lampiran, kemudian dilarutkan ke dalam air laut komersil hingga volume 1 liter. Hasil larutan stok yang dibuat diujikan nilai total kromiumnya ke Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI) Surabaya, Jawa Timur. Hasil yang didapatkan adalah ternyata jumlah total kromium yang ada pada larutan stok hanya sebesar 1.694,51 mg/L dengan kata lain kemurnian yang dihasilkan sebesar 84,73 %. Karena hasil uji total kromium diketahui setelah melakukan uji MIC dan RFT, maka konsentrasi MIC dan RFT yang digunakan pada kenyataannya sebesar 0 mg/L, 16,94 mg/L, 42,36 mg/L, 84,72 mg/L, 169,44 mg/L dan 338,88 mg/L atau dengan melakukan pembulatan ke atas yakni sebesar 0 mg/L, 17 mg/L, 42 mg/L, 85 mg/L, 169 mg/L, dan 339 mg/L.

#### **4.1.1 Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Chromium pada Bakteri Azotobacter S8**

Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dilakukan selama 24 dan 48 jam dan diteruskan hingga 168 jam. Bakteri *Azotobacter S8* diinokulasikan pada media agar datar yang telah diberikan pencemar kromium masing-masing sesuai dengan range hasil konsentrasi sebelumnya. Media agar datar tersebut nantinya dibuat dengan mencampurkan media NA sebanyak 5 mL dengan 5 mL pencemar bersalinitas 70 ppt. Pencemar dengan salinitas awal 70 ppt dibuat dengan mengencerkan stok kromium menggunakan air laut komersil dan ditambahkan NaCl

hingga salinitasnya mencapai angka tersebut. Hal ini untuk menciptakan media tumbuh dengan salinitas 35 ppt yang terjadi akibat peristiwa saling encer antar keduanya. Angka tersebut digunakan karena di dalam reaktor utama, salinitas pencemar akan dibuat 35 ppt supaya menunjang pertumbuhan *Chlorella vulgaris*.

Adapun metode yang digunakan adalah metode screening (Shrivastava, et.al., 2013). Tujuan dilakukan uji screening adalah untuk menentukan kadar yang digunakan pada tahap uji penyisihan logam berat kromium. Adapun hasil dari uji screening dan inkubasi selama 24 jam – 168 jam dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan 4.5 berikut ini.

**Tabel 4. 4 Hasil Uji Minimum Inhibitory Concentration Terhadap *Azotobacter* S8 pada Konsentrasi Kromium 0, 17, dan 42 mg/L**

Jam ke-	Konsentrasi Kromium		
	0	17	42
24			
48			
72			

Jam ke-	Konsentrasi Kromium		
	0	17	42
96			
120			
144			
168			

**Tabel 4. 5 Hasil Uji Minimum Inhibitory Concentration Terhadap Azotobacter S8 pada Konsentrasi Kromium 85, 169, dan 339 mg/L**

Jam ke-	Konsentrasi Kromium		
	85	169	339
24			

Jam ke-	Konsentrasi Kromium		
	85	169	339
48			
72			
96			
120			
144			
168			

Berdasarkan Tabel 4.4 diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi kromium yang dipaparkan ke dalam media menyebabkan semakin sedikitnya bakteri yang tumbuh dalam media tersebut. Pada media yang tidak mengandung kromium *Azotobacter* S8 menunjukkan pertumbuhan yang sangat baik. Pada konsentrasi 17 mg/L  $K_2Cr_2O_7$  juga menunjukkan pertumbuhan bakteri sangat baik. Hal ini menunjukkan bahwa kedua bakteri tersebut memiliki toleransi yang tinggi terhadap konsentrasi tersebut.

Pada konsentrasi 42 mg/L, *Azotobacter* S8 menunjukkan pertumbuhan yang cukup baik setelah 72 jam inkubasi. Hal ini menunjukkan bahwa *Azotobacter* S8 mulai terhambat pertumbuhannya dengan meningkatnya kadar kromium yang dipaparkan. Sedangkan pada konsentrasi 85 mg/L, 169 mg/L dan 339 mg/L  $K_2Cr_2O_7$  tidak menunjukkan adanya pertumbuhan Pavel et al (2012) menyatakan bahwa *Azotobacter* S8 memiliki toleransi yang tinggi terhadap logam berat kromium dengan kadar antara 0 – 50 mg/L.

Dari pengamatan MIC dilakukan skoring terhadap hasil yang diperoleh. Skoring MIC ditentukan berdasarkan luasan permukaan pertumbuhan bakteri dan perubahan warna yang dibandingkan dengan pertumbuhan bakteri kontrol. Akan tetapi kriteria yang diutamakan adalah luasan permukaan pertumbuhan bakteri. Hal ini ditentukan karena persebaran bakteri pada media menandakan bakteri tersebut masih dapat bertahan hidup. Adapun kriteria skoring MIC yang digunakan adalah sebagai berikut:

- +++++ = Luas tumbuh bakteri dibandingkan dengan kontrol adalah 81-100% dan/atau tidak terjadi perubahan warna
- ++++ = Luas tumbuh bakteri dibandingkan dengan kontrol adalah 61-80% dan/atau tidak terjadi perubahan warna

- +++ = Luas tumbuh bakteri dibandingkan dengan kontrol adalah 41-60% dan/atau tidak terjadi perubahan warna
- ++ = Luas tumbuh bakteri dibandingkan dengan control adalah 21-40% dan/atau terjadi perubahan warna
- + = Luas tumbuh bakteri dibandingkan dengan kontrol adalah  $\leq 20\%$  dan/atau terjadi perubahan warna
- = Tidak ada pertumbuhan bakteri

Adapun luas permukaan pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Lampiran serta hasil skoring pertumbuhan bakteri pada uji MIC dapat dilihat pada dan Tabel 4.5.

**Tabel 4. 6 Skoring Pertumbuhan Bakteri Pada Uji MIC**

Bakteri	Konsentrasi $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)					
	0	17	42	85	169	339
<b>Azotobacter S8</b>	+++++	++++	+	-	-	-

Berdasarkan Tabel 4.6 dapat ditentukan bahwa nilai MIC bakteri uji adalah 42 mg/L  $K_2Cr_2O_7$  yang mana pada konsentrasi tersebut bakteri Azotobacter S8 terhambat dan atau tidak dapat tumbuh dengan baik. Adapun nilai Maximum Tolerance Concentration (MTC) yang merupakan nilai konsentrasi maksimum yang toleran terhadap Azotobacter S8 adalah 17 mg/L. Dan nilai Minimum Bacteriacidal Concentration (MBC) yang merupakan nilai konsentrasi minimum yang mampu membunuh 99,9% Azotobacter S8 dalam media uji adalah 85 mg/L.

#### **4.1.2 Uji Range Finding Test (RFT) Chromium pada Mikroalga *Chlorella vulgaris***

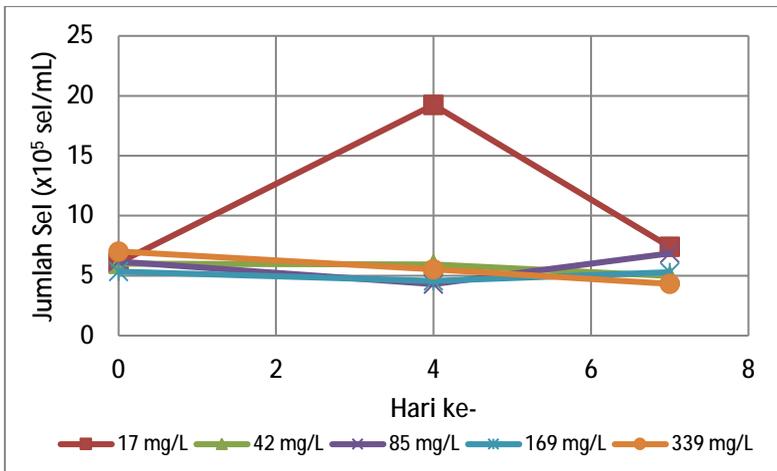
Range Finding Test pada dasarnya memiliki tujuan untuk mengkondisikan mikroalga dengan pencemar  $K_2Cr_2O_7$  supaya mikroalga dapat tetap hidup dan melakukan treatment secara optimal. Range Finding Test dilakukan dengan menggunakan

konsentrasi yang berbeda pada 5 rentang konsentrasi dalam reaktor untuk mengukur tingkat toksisitas kromium terhadap mikroalga *Chlorella vulgaris*.

Berdasarkan USEPA Guidelines 850.5400, jumlah konsentrasi yang divariasikan harus berjumlah 5 konsentrasi dengan rentang variasi mengikuti deret geometri dengan rasio 1,5-2. Konsentrasi yang diuji adalah mengikuti nilai konsentrasi pada uji MIC yaitu 0 mg/L sebagai kontrol, 17 mg/L, 42 mg/L, 85 mg/L, 169 mg/L, dan 339 mg/L. Pengujian dilakukan dalam labu erlenmeyer 250 mL yang berlangsung selama 7 hari dengan pencahayaan 6000 - 7000 Lux, rasio gelap terang 12/12, serta dilakukan diatas shaker dengan kecepatan 130 rpm. Perbandingan inokulum dan media adalah 10% : 90%. Media pencemar dibuat dengan mengencerkan larutan stok kromium dengan konsentrasi masing-masing menggunakan air laut komersil. Kemudian media disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1,1 atm. Ditambahkan nutrient berupa pupuk walne dan vitamin ke dalam media dengan konsentrasi 1 mL/L media. Dilakukan perhitungan jumlah sel *Chlorella vulgaris* pada hari ke-0, ke-4, dan ke-7. Hasil perhitungan jumlah sel *Chlorella vulgaris* dapat dilihat pada tabel berikut.

**Tabel 4. 7 Jumlah Sel *Chlorella vulgaris* Pada Uji RFT  
(dalam  $10^5$  sel/mL)**

Hari ke	Konsentrasi Kromium (mg/L)					
	0	17	42	85	169	339
0	7.1	6.08	6	6.18	5.34	7.02
4	34.86	19.24	5.94	4.3	4.56	5.52
7	1400	7.42	4.98	6.86	5.3	4.32



**Gambar 4. 16 Grafik Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Pada Uji RFT**

Hasil Range Finding Test tersebut menunjukkan bahwa rate pertumbuhan terbaik terletak pada konsentrasi pencemar 17 mg/L yang mana memiliki efek pertumbuhan sebesar 122% dibandingkan dengan 4 konsentrasi lainnya. Dan hanya pada konsentrasi 17 mg/L saja, pada hari ke-4 jumlah sel mengalami peningkatan. Berdasarkan pengamatan fisik, hanya konsentrasi 17 mg/L saja yang mengalami perubahan warna. Berikut ini merupakan hasil pengamatan fisik uji RFT.

**Tabel 4. 8 Hasil Pengamatan Fisik Uji Range Finding Test**

Cr <sup>6+</sup> (mg/L)	Hari Ke							
	0	1	2	3	4	5	6	7
0								

Cr <sup>6+</sup> (mg/L)	Hari Ke							
	0	1	2	3	4	5	6	7
17								
42								
85								
169								
339								

Dari hasil uji MIC dan RFT dapat diketahui bahwa kedua jenis mikroorganismenya memiliki nilai toleransi yang sama terhadap kromium yaitu pada konsentrasi 17 mg/L. Namun pada dasarnya uji toleransi seharusnya dapat dilakukan dengan konsorsium. Sehingga dapat diketahui secara pasti nilai toleransi maksimum

oleh keduanya. Pada penelitian ini, penulis hanya melakukan uji toleransi menggunakan single culture. Oleh karenanya pada penelitian lanjutan dapat dilakukan uji toleransi menggunakan konsorsium untuk melengkapi penelitian ini.

Berdasarkan hasil tersebut, pada penelitian utama akan digunakan konsentrasi kromium 17 mg/L pada media pencemar yang selanjutnya akan diuji removalnya oleh konsorsium antara bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris*. Adapun hasil ini juga dapat menjadi bukti bahwa kedua mikroorganisme uji merupakan mikroorganisme aerob, karena  $K_2Cr_2O_7$  pada dasarnya merupakan oksidator kuat yakni melepaskan oksigen pada media (Holleman, et.al, 1985).

### **4.3 Penelitian Utama**

#### **4.3.1 Uji Penyisihan Logam Berat Kromium**

Tahap uji penyisihan logam berat kromium merupakan tahap utama pada penelitian ini. Penelitian utama dilakukan selama 7 hari dan dilakukan pengulangan sebanyak 1 kali (duplo). Waktu penelitian yang digunakan merupakan kriteria waktu kontak penggunaan sistem High Rate Algal Reactor yakni 2-6 hari (Mara, 2003). Penambahan 1 hari dilakukan sebagai tambahan waktu untuk proses aklimatisasi kedua mikroorganisme. Seluruh inokulum awal baik bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* yang digunakan pada penelitian ini berada pada fase eksponensial yang ditentukan sesuai dengan hasil penelitian pendahuluan. Menurut Hamdiyati (2011), fase eksponensial merupakan fase dimana sel mikroorganisme berada pada kondisi metabolisme paling baik yakni stabil dan mampu membelah diri secara berganda. Reaktor diberi pencahayaan sinar artifisial dengan intensitas 6000-7000 Lux dan dilakukan pengadukan secara terus menerus. Pada tahap ini dilakukan analisis terhadap beberapa parameter tambahan yaitu suhu, pH, salinitas, jumlah sel mikroalga, dan

jumlah koloni bakteri. Serta dilakukan pula analisis terhadap parameter utama penelitian ini yaitu total kromium.

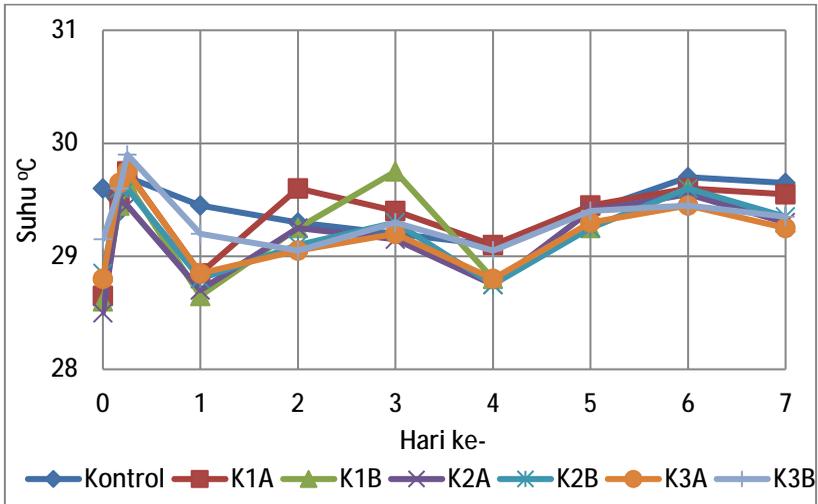
Pengukuran nilai suhu, pH, dan salinitas dilakukan setiap 24 jam sekali hingga hari ke-7 dan pada jam ke-4 dan jam ke-6. Hal ini dilakukan untuk mengetahui trend parameter tersebut pada uji penyisihan logam kromium yang mana ketiga parameter tersebut memiliki pengaruh terhadap perkembangbiakan sel mikroorganisme uji. Pengukuran jumlah sel mikroalga dilakukan setiap 24 jam selama 7 hari. Hal tersebut dilakukan karena pada umumnya perkembangan dan perbanyakan sel *Chlorella* terjadi dalam kurun waktu 4 – 14 jam tergantung pada lingkungan pendukungnya (Suriawiria, 1986). Selanjutnya pengukuran jumlah koloni bakteri dilakukan pada jam ke-0, jam ke-4, dan jam ke-6 serta dilakukan pada hari ke-1, ke-4 dan ke-7. Pemilihan waktu tersebut didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan yang mana trend pertumbuhan sel terlihat setiap 2 jam. Sedangkan hari ke-4 dipilih berdasarkan waktu eksponensial mikroalga pada uji RFT dan hari ke-7 yang merupakan akhir masa uji. Tujuan dari perhitungan sel kedua mikroorganisme adalah untuk mengetahui jumlah mikroorganisme yang hidup pada proses penyisihan kromium. Dan parameter utama yakni total kromium dilakukan di awal dan akhir masa uji untuk mengetahui persentase penyisihan yang dilakukan oleh mikroorganisme uji. Adapun hasil dari parameter-parameter tersebut dijelaskan pada sub-subbab berikut ini.

#### **4.3.1.1 Suhu**

Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam proses penyisihan logam berat (Inungaray et al., 2014). Pada suhu optimum bakteri dan mikroorganisme lain dapat menyisihkan logam berat lebih optimal karena proses metabolisme bakteri dapat bekerja dengan baik (Leroi et al., 2012). *Azotobacter* S8 merupakan bakteri mesofilik yang dapat hidup dengan rentang suhu 20 – 40°C. Sedangkan Menurut Tjahjo, et.al. pada tahun

2002, suhu optimum pertumbuhan *Chlorella vulgaris* adalah berkisar antara 25 – 34°C.

Adapun hasil pengukuran suhu harian dapat dilihat pada gambar 4.17 berikut ini.



**Gambar 4. 17 Grafik Suhu Harian Tiap Reaktor**

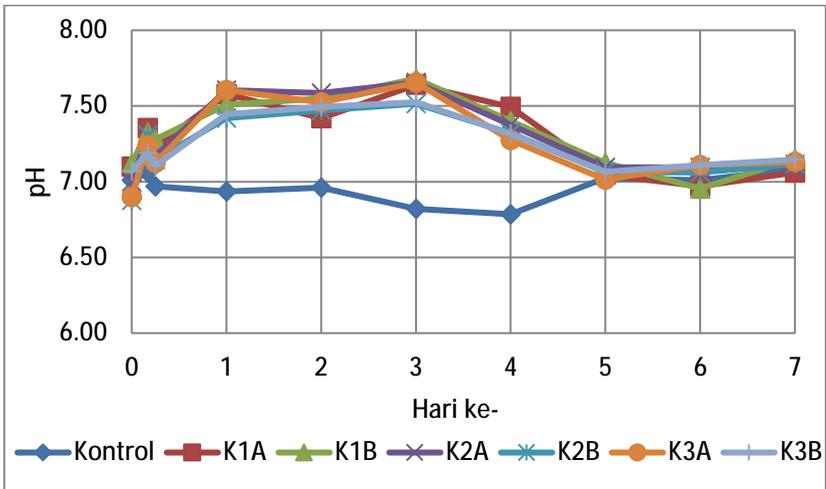
Berdasarkan Gambar 4.17 diketahui rata-rata suhu yang terukur pada masing-masing reaktor dengan variabel berbeda berkisar antara 29,2°C – 29,3°C. Sedangkan rata-rata suhu untuk kontrol yaitu 29,5°C. Rentang suhu yang terukur masih termasuk dalam range suhu optimum pertumbuhan kedua mikroorganisme uji. Naik turunnya nilai suhu dapat disebabkan oleh adanya perpindahan panas dari cahaya yang digunakan.

#### **4.3.1.2 pH**

Selain suhu, faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan mikroalga adalah pH. Menurut Leroi et al. (2012) pada pH optimum proses penyisihan logam berat akan terjadi

lebih optimal. Adapun hasil pengukuran pH dapat dilihat pada gambar 4.18.

Berdasarkan Gambar 4.18 diketahui bahwa nilai pH pada tiap reaktor berkisar antara 6,97 – 7,31. Sedangkan pH untuk kontrol terukur antara 6,82 – 7,09. Abat pada tahun 2006 menyatakan bahwa bakteri *Azotobacter* S8 dapat hidup dengan pH berkisar antara 4,8 – 8,5 dengan pH optimal 7 – 7,5. Sedangkan pH optimum pertumbuhan *Chlorella vulgaris* menurut Krisanti (2003) adalah berkisar antara 7-8.



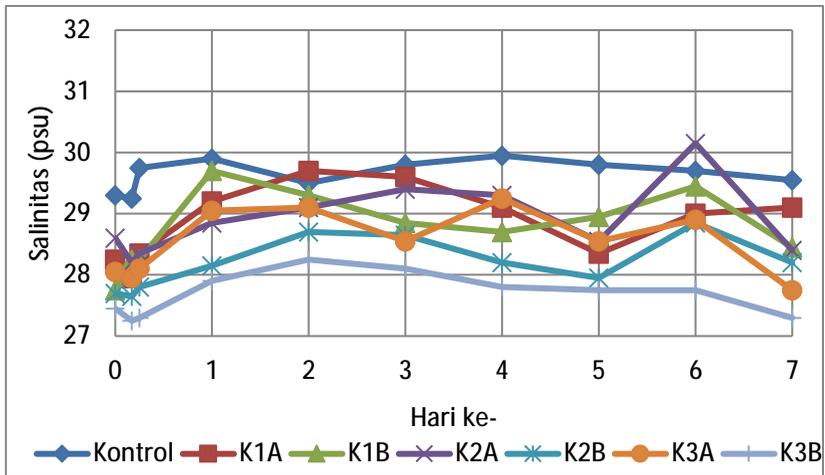
**Gambar 4. 18 Grafik pH Harian Tiap Reaktor**

Menurut Cheng dan Li (2009), pH larutan kromium cenderung basa. Kecenderungan kenaikan pH pada larutan kromium disebabkan adanya aktifitas bakteri dan mikroalga serta penumpukan sel mati dari keduanya. Selain itu juga disebabkan oleh adanya aktivitas fotosintesis mikroalga yang mana pada saat terjadi fotosintesis, mikroalga akan memanfaatkan senyawa  $\text{CO}_2$  bebas dan terlarut sebagai sumber karbon anorganik utama yang digunakan sehingga

menyebabkan pH naik akibat konsentrasi CO<sub>2</sub> terlarut yang menurun (Prihantini, et.al, 2005). Kenaikan pH pada hari ke-0 hingga ke-1 juga menandakan bahwa fase pertumbuhan bakteri telah mendekati fase stasioner (Gaudy dan Gaudy, 1980).

#### 4.3.1.3 Salinitas

Parameter penting selanjutnya adalah salinitas media tumbuh. Menurut Prabowo (2009), nilai salinitas optimum diperlukan untuk menjaga ketahanan membran sel agar tidak cepat lisis. Menurut Isnansetyo dan Kurniasuty pada tahun 1995, *Chlorella vulgaris* tumbuh optimal pada salinitas 25 – 30 ppt sementara pada salinitas 15 ppt tumbuh lambat dan tidak tumbuh pada salinitas 0 ppt dan 60 ppt. Sedangkan bakteri *Azotobacter* S8 dapat tumbuh hingga salinitas 10% atau 100 ppt (Akhter, et.al, 2012). Berikut ini merupakan hasil pengukuran salinitas harian pada tiap reaktor.

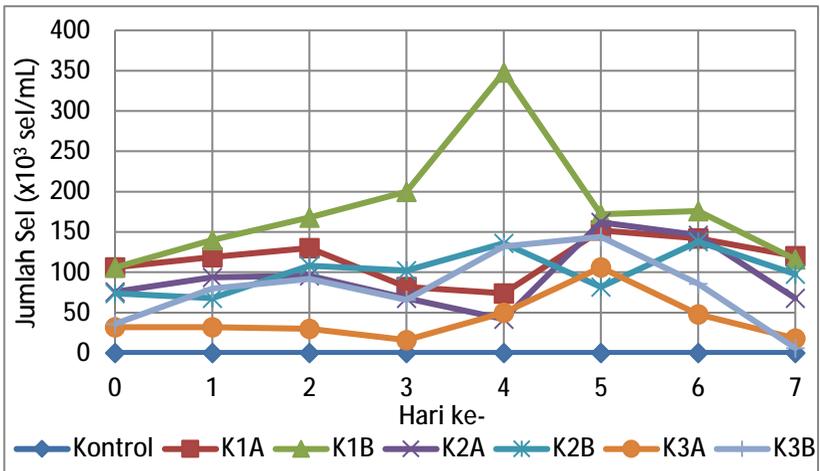


Gambar 4. 19 Grafik Nilai Salinitas Harian Tiap Reaktor

Berdasarkan gambar 4.19 tersebut nilai salinitas rata-rata reaktor dengan perlakuan berkisar antara 27,7 – 28,9 psu. Sedangkan reaktor kontrol memiliki salinitas rata-rata sebesar 29,7 psu. Nilai tersebut masih dalam rentang salinitas yang cukup untuk perkembangan kedua mikroorganisme di dalam reaktor.

#### 4.3.1.4 Jumlah Sel Mikroalga

Parameter jumlah sel mikroalga digunakan untuk mengetahui jumlah sel mikroalga yang hidup pada proses penyisihan logam berat kromium. Metode yang digunakan dalam menentukan jumlah sel mikrolaga yaitu dengan menggunakan alat Haemocytometer Nebauer Improved (Brand, Jerman). Sel hidup yang terlihat pada kamar-kamar baca dihitung dan ditentukan kepadatan selnya. Adapun trend jumlah sel mikroalga yang terhitung pada masing-masing reaktor ditunjukkan pada gambar 4.20 berikut ini.



Gambar 4. 20 Grafik Jumlah Sel Mikroalga Harian Tiap Reaktor

Dari grafik tersebut diketahui trend jumlah sel mikroalga rata-rata berada di fase eksponensial pada hari ke-4 (K1B, dan K2B) dan ke-5 (K1A, K2A, K3A, dan K3B). Hal ini sesuai dengan hasil uji RFT pada penelitian pendahuluan bahwa pada konsentrasi 17 mg/L fase eksponensial terjadi pada hari ke-4. Rata-rata fase aklimatisasi terjadi pada hari ke-0 hingga hari ke-2. Sedangkan fase stasioner terjadi setelah hari ke-4 dan ke-5. Pada reaktor control tidak ditemukan mikroalga *Chlorella vulgaris* yang tumbuh dikarenakan pada reaktor tersebut tidak diberikan penambahan mikroorganisme. Sedangkan jumlah sel paling banyak terlihat pada reaktor K1B. Hal ini dikarenakan komposisi penambahan mikroalga yang paling banyak terdapat pada reaktor tersebut.

Menurut Safi, et.al. (2014), dinding sel *Chlorella vulgaris* mengandung hemiselulosa, yang menyumbang stabilitas dan kekakuan sel. Hal ini menyebabkan sel memiliki siklus reproduksi aseksual. Proses reproduksi berlangsung dengan cara sel akan memproduksi autospora dari sel besar yang telah matang dan akan membagi sel menjadi unit yang lebih kecil. Reproduksi aseksual terjadi apabila satu sel dewasa telah terbagi menjadi empat sel baru. Proses tersebut berlangsung setiap 16-20 jam.

Pertumbuhan sel meningkat pesat dalam enam hari pertama, kemudian melambat dalam enam hari ke depan, dan akan meningkat lagi setelah tiga belas hari tumbuh. Pertumbuhan yang naik turun tersebut dapat disebabkan oleh konsumsi bertahap unsur gizi tertentu seperti nitrogen dan fosfor dalam medium (Ramaraj, et.al, 2014).

#### **4.3.1.5 Jumlah Koloni Bakteri**

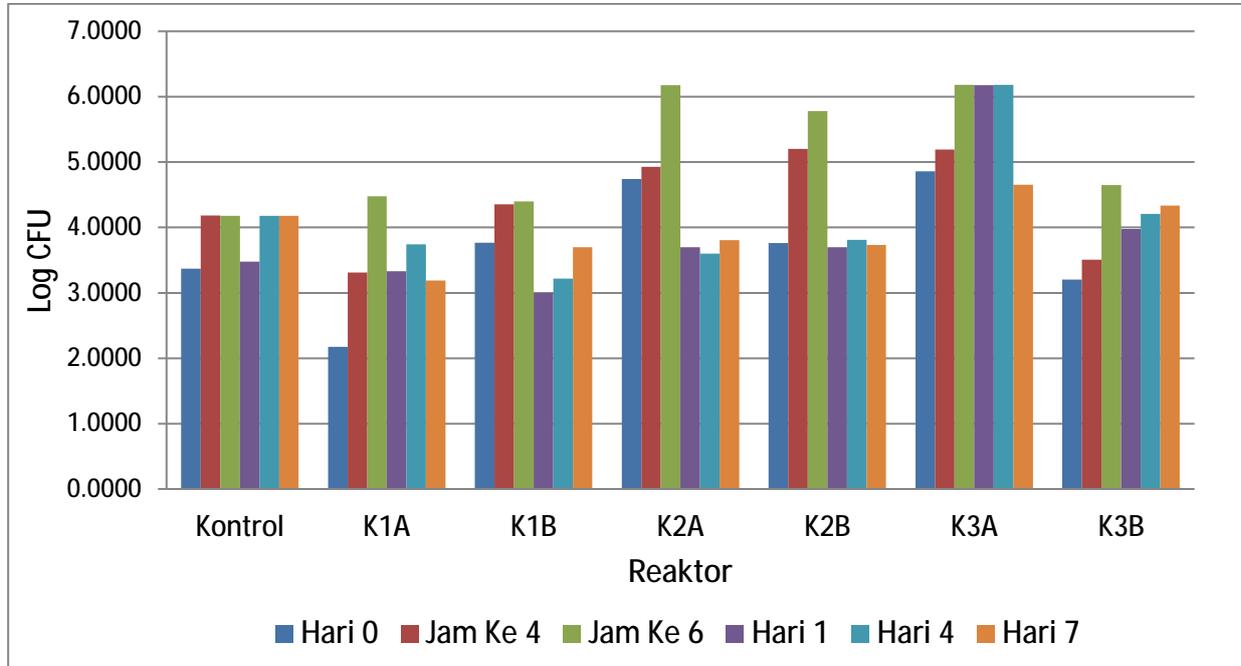
Jumlah koloni bakteri merupakan salah satu parameter yang diukur untuk mengetahui jumlah bakteri yang hidup pada proses penyisihan logam berat kromium. Adapun metode yang digunakan adalah metode CFU (Colony Forming Units).

Dilakukan pengenceran terhadap sampel hingga  $10^5$ . Hal ini bertujuan agar bakteri yang terbentuk dapat dihitung sesuai rentang yang ditentukan yaitu 30-300 koloni.

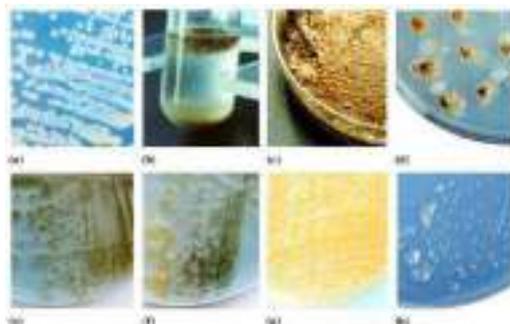
Pada perhitungan parameter ini, penulis menggunakan media Nutrient Agar. Sehingga, koloni yang terbentuk tidak hanya koloni yang berasal dari bakteri *Azotobacter S8*. Pada perhitungan ini, sampel hanya dihitung menggunakan pengenceran  $10^3$  hingga  $10^5$  dikarenakan pada rentang tersebut jumlah koloni masih dapat terhitung. Adapun hasil pengamatan jumlah koloni setelah 24 jam dapat dilihat pada Gambar 4.23 berikut.

Pada grafik tersebut, perhitungan jumlah koloni bakteri hanya dilakukan pada hari ke-0, jam ke-4, jam ke-6, hari ke-1, hari ke-4, dan hari ke-7. Pemilihan waktu tersebut didasarkan pada laju pertumbuhan kedua mikroorganisme yang telah dilakukan pada penelitian pendahuluan yakni pada jam ke-6 bakteri *Azotobacter S8* mengalami fase eksponensial, sedangkan pada *Chlorella vulgaris* terjadi pada hari ke-4. Grafik tersebut menunjukkan bahwa rata-rata bakteri mengalami fase eksponensial pada jam ke-6. Hal ini sesuai dengan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan oleh Imron dan Purwanti (2015) bahwa fase eksponensial *Azotobacter S8* berada pada jam ke 6 setelah inokulasi.

Selain itu, pada grafik tersebut ditunjukkan bahwa pada reaktor kontrol terjadi pertumbuhan bakteri. Tidak dapat dipastikan bahwa bakteri yang terhitung adalah bakteri *Azotobacter S8*. Hal ini dikarenakan penggunaan media NA yang universal sebagai media pertumbuhan sebagian besar jenis bakteri. Proses perhitungan dilakukan dengan melihat morfologi fisik koloni *Azotobacter S8* yang disesuaikan dengan penelitian terdahulu. Menurut Aquilanti et.al (2004), *Azotobacter* memiliki koloni berbentuk pellicle atau bulat berwarna putih hingga cream, kuning, dan putih kekuningan. Perbedaan warna didasarkan pada perbedaan spesies.



Gambar 4. 21 Grafik Jumlah Koloni Bakteri Tiap Reaktor



**Gambar 4. 22 Beberapa Morfologi Koloni Azotobacter**

Sumber : Aquilanti et.al, 2004

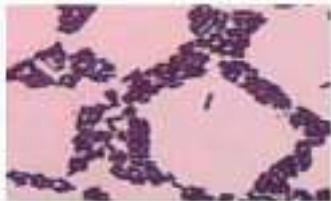
Azotobacter S8 yang digunakan pada penelitian ini awalnya merupakan hasil isolasi yang dilakukan oleh Zulaika, dkk pada tahun 2012. Inokulat diisolasi dari sedimen sungai Kalimas Surabaya dan diberikan kode S8. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa inokulat dengan kode S8 merupakan bakteri dari kelas Azotobacter. Oleh karenanya, tidak dapat dipastikan spesies Azotobacter yang digunakan pada penelitian ini. Sehingga perhitungan jumlah koloni bakteri yang dilakukan didasarkan pada morfologi Azotobacter secara umum.

Dapat dipastikan bahwa terjadi kontaminasi yang ditunjukkan oleh reaktor kontrol. Ada beberapa alasan yang mendasari terjadinya kontaminasi tersebut diantaranya seperti sterilisasi reaktor yang kurang sempurna dan juga berasal dari udara luar akibat reaktor yang tidak 100% dapat tertutup. Oleh karena itu, penulis melakukan klarifikasi sederhana terhadap hasil hitungan dengan melakukan pewarnaan gram pada koloni yang terhitung. Sampel diambil secara acak sebanyak 3 buah. Berikut ini hasil pewarnaan gram yang dilakukan.

**Tabel 4. 9 Sampel Pewarnaan Gram**

No	Kode Sampel	Penampakan
1	S1	
2	S2	
3	S3	

Pada table tersebut terlihat bahwa koloni ketiga sampel terlihat sama dengan koloni *Azotobacter* menurut Aquilanti et.al (2004). Menurut Erfin, et.al (2016), bakteri *Azotobacter* yang diwarnai akan memiliki morfologi sebagai berikut.



**Gambar 4. 23 Morfologi *Azotobacter* Pada Pewarnaan Gram**

Sumber : Erfin, et.al, 2016

Menurut Abdel-Hamid, et.al (2010) Azotobacter merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang. Oleh karenanya, pada proses pewarnaan gram akan terlihat bakteri Azotobacter berbentuk batang berwarna kemerahan. Sesuai dengan pendapat yang dikemukakan oleh H.C.J. Gram, seorang histologist berkebangsaan Denmark pada tahun 1884, menyatakan bahwa prosedur pewarnaan gram dimulai dengan pemberian warna basa yaitu Kristal Violet (KV). Larutan iodin yang kemudian ditambahkan menyebabkan semua bakteri terwarnai ungu pada fase ini. Kemudian preparat dicuci dengan alkohol 96%. Sel gram positif akan tetap mengikat senyawa Kristal Violet-Iodine, sehingga berwarna ungu akibat peptidoglikan yang terkandung pada dinding sel gram positif sangat tebal. Sedangkan sebaliknya gram negatif akan hilang warnanya oleh alkohol akibat peptidoglikan yang tipis pada dinding selnya. Setelah itu preparat ditambahkan fuchsin yang berwarna merah. Akibat penambahan fuchsin, sel bakteri gram negatif akan berwarna merah sedangkan gram positif akan berwarna ungu.

Berikut ini merupakan hasil dari pewarnaan gram pada masing-masing sampel uji yang dilakukan dan dilihat di bawah mikroskop perbesaran 1000x.

**Tabel 4. 10 Hasil Pewarnaan Gram**

No	Kode Sampel	Hasil
1	S1	

No	Kode Sampel	Hasil
2	S2	
3	S3	

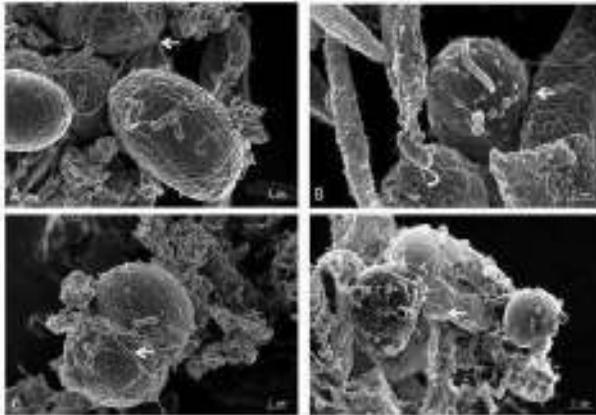
Dari ketiga sampel, hanya kode S3 yang merupakan bakteri gram positif. Namun jika dilihat lebih teliti, pada sampel S3 masih terdapat bakteri gram negatif. Hal ini disebabkan oleh pengambilan inokulum di beberapa titik koloni. Warna inokulum yang berbeda dapat disebabkan oleh ketidakteelitian pewarnaan gram. Karena pewarnaan gram sangat bergantung pada lamanya pewarnaan. Sehingga kemungkinan terjadi kesalahan sangat tinggi. Untuk membuktikan kebenaran hasil pewarnaan, penulis melakukan pewarnaan gram pada inokulat awal *Azotobacter* S8 yang ditambahkan ke dalam reaktor. Berikut ini hasil pewarnaan yang dilakukan.



**Gambar 4. 24 Hasil Pewarnaan Gram Pada Inokulat Awal**

Dari hasil pewarnaan tersebut dapat dipastikan bahwa yang terhitung adalah *Azotobacter* S8 jika disesuaikan dengan hasil pewarnaan pada penelitian terdahulu. Tingkat kepercayaan tidak 100%, dikarenakan ada banyak faktor yang harus dipenuhi dalam melakukan identifikasi bakteri. Namun secara morfologi hasil tersebut dapat menjadi dasar bahwa koloni yang terhitung adalah koloni *Azotobacter* S8. Selain itu, dapat dipastikan pula terjadinya kontaminasi dengan munculnya bakteri gram positif pada salah satu sampel. Ada beberapa hal yang menjadi alasan adanya kontaminasi tersebut. Selain dari tidak sterilnya reaktor sepenuhnya sesuai pembahasan sebelumnya, associated bacteria atau bakteri yang menempel pada inokulum *Chlorella vulgaris* dapat menjadi salah satu penyebabnya.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Krohn-Molt, et.al. pada tahun 2013 ada beberapa jenis bakteri yang menempel pada tubuh sel *Chlorella vulgaris*. Penelitian dilakukan dengan menganalisis biofilm yang terbentuk pada Photobioreactor.



**Gambar 4. 25 Hasil Uji SEM pada Sel *Chlorella vulgaris***  
Sumber : Krohn-Molt, et.al, 2013

Dari hasil uji SEM (Scanning Electron Micrograph) tersebut, terdapat banyak jenis bakteri yang menempel di permukaan dinding sel *Chlorella vulgaris*. Hal ini mengindikasikan bahwa kultur *Chlorella vulgaris* murni sangat sulit untuk didapatkan mengingat mikroalga juga memerlukan bantuan makhluk hidup lain dalam berkembang biak. Adapun Krohn-Molt, dkk juga melakukan identifikasi dan klasifikasi bakteri-bakteri tersebut dan didapatkan hasil sebagai berikut.



**Gambar 4. 26 Hasil Identifikasi Associated-Bacteria pada *Chlorella vulgaris***

Sumber : Krohn-Molt, et.al, 2013

Dari hasil identifikasi tersebut, Actinobacteria merupakan satu-satunya bakteri gram positif berbentuk batang yang menempel pada *Chlorella vulgaris*. Oleh karenanya, kemungkinan kontaminasi tersebut berasal dari spesies ini. Namun pada dasarnya, hal ini tidak menjadi masalah dikarenakan seyogyanya High Rate Algal Reactor dalam skala lapangan merupakan kolam terbuka yang tidak akan pernah lepas dari kontaminasi bakteri lain.

#### 4.3.1.6 Total Kromium

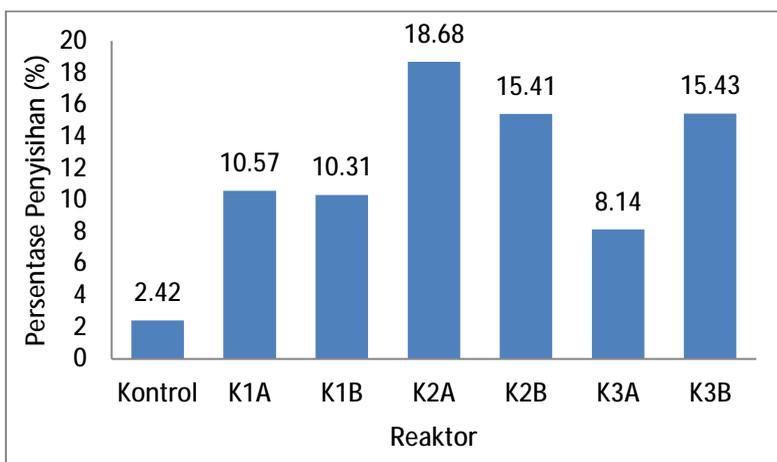
Parameter total kromium diukur pada waktu awal dan akhir penelitian. Tujuannya adalah untuk mengetahui persentase penyisihan kromium oleh konsorsium bakteri dan mikroalga. Pada penelitian ini, percobaan dilakukan secara duplo dan hasil uji total kromium yang digunakan adalah berdasarkan rerata hasil dari kedua percobaan. Metode pengujian menggunakan Atomic Absorption Spectroscopy (AAS). Sehingga hasil yang muncul adalah total kromium bukan spesi-spesinya. Adapun hasil pengukuran total kromium dapat dilihat pada Tabel 4.11.

**Tabel 4. 11 Kadar Total Kromium Dengan Metode AAS**

Waktu	Konsentrasi Total Kromium (mg/L)						
	Kontrol	K1A	K1B	K2A	K2B	K3A	K3B
<b>Awal</b>	16,72	16,70	16,69	16,68	16,65	16,71	16,73
<b>Akhir</b>	16,32	14,93	14,97	13,56	14,09	15,35	14,15

Berdasarkan Tabel 4.11 diketahui bahwa larutan kromium yang mengandung *Azotobacter S8* dan *Chlorella vulgaris* mengalami penurunan konsentrasi. Hal ini membuktikan bahwa konsorsium tersebut dapat menyisihkan logam berat kromium. Bakteri dan mikroalga membutuhkan kromium sebagai nutrisi dalam jumlah kecil untuk tetap hidup (Benazier et al., 2010). Pada reaktor kontrol konsentrasi kromium juga mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena ketidakstabilan larutan kromium serta tidak dilakukan kontrol terhadap pH larutan kromium. Abdulla et al (2010) menyatakan pengurangan kromium pada reaktor kontrol juga dimungkinkan karena adanya reduksi spontan atau terjadinya adhesi pada permukaan reaktor yang digunakan. Hal ini disebabkan karena adanya pengaruh lingkungan seperti suhu serta kecepatan pengadukan. Adapun berdasarkan hasil uji total koloni bakteri, pada reaktor kontrol telah ditemukan bakteri kontaminan sejak hari ke-0 yang disebabkan oleh

beberapa faktor seperti sterilisasi reaktor yang kurang sempurna. Namun, penurunan yang terjadi pada reaktor kontrol tidak terlalu besar dibandingkan dengan reaktor lainnya. Dari hasil uji koloni bakteri dan jumlah sel mikroalga pada subbab sebelumnya, dapat diketahui bahwa hingga hari ke-7 atau akhir masa uji, masih terdapat peran dari mikroorganismenya uji. Adapun persentase penyisihan tiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.27 berikut.

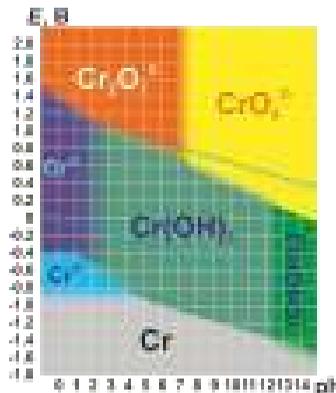


**Gambar 4. 27 Persentase Penyisihan Logam Berat Kromium oleh Konsorsium Bakteri dan Mikroalga**

Berdasarkan Gambar 4.27 diketahui bahwa persentase penyisihan tertinggi adalah 18,68% oleh konsorsium 50% *Azotobacter* S8 dengan 50% *Chlorella vulgaris* pada penambahan inokulum awal 5% ke dalam reaktor. Sedangkan persentase terendah adalah 8,14% oleh konsorsium 75% *Azotobacter* S8 dengan 25% *Chlorella vulgaris* pada penambahan inokulum awal 5% ke dalam reaktor dengan total waktu uji adalah 7 hari.

Karena menggunakan metode AAS, kromium yang terukur tidak dapat dipastikan spesinya. Untuk memastikan bahwa kromium yang disisihkan merupakan spesi kromium (VI) dan yang melakukan penyisihan adalah konsorsium, perlu dilakukan uji lanjutan pada penelitian selanjutnya. Pengujian tersebut dapat menggunakan metode SEM-EDX (Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) pada biomassa kering yang dihasilkan. Selain itu juga dapat dilakukan pengukuran berat kering biomassa menggunakan metode gravimetri. Sehingga dapat dipastikan bahwa persentase kromium yang turun merupakan hasil dari konsorsium dan berasal dari spesi kromium (VI).

Namun, berdasarkan diagram Pourbaix, larutan  $K_2Cr_2O_7$  (sebagaimana yang digunakan sebagai bahan dasar pembuatan limbah sintesis dalam penelitian ini) dalam air murni yang memiliki pH basa (rata-rata pH reaktor 6,97 – 7,31) akan berbentuk spesi  $CrO_4^{2-}$  yang berwarna kuning. Hal ini sesuai dengan warna larutan yang terjadi saat penelitian. Sehingga hal ini dapat menjadi bukti dasar bahwa sebenarnya kromium yang ter-uptake merupakan spesi  $Cr^{6+}$  atau hexavalent chromium.



**Gambar 4. 28 Diagram Pourbaix Kromium**

Sumber : Kotas dan Stasicka, 2000

Menurut Nithya, et.al (2011) bakteri yang berada pada lingkungan tercemar logam berat akan mempunyai sifat resistensi terhadap logam berat tersebut melalui mekanisme biosorpsi dan bioakumulasi. *Azotobacter S8* memiliki Eksopolisakarida (EPS) pada dinding selnya yang berfungsi sebagai pengkelat atau pengadsorpsi logam berat di permukaan sel (Iyer et.al., 2005). Sifat inilah yang menyebabkan logam berat dapat diadsorpsi oleh *Azotobacter* (Erni et al., 2011). Kemampuan *Azotobacter S8* melakukan mekanisme detoksifikasi ekstraseluler juga terjadi akibat interaksi logam kromium dengan gugus hidroksil pada selulosa yang melapisi dinding sel bakteri. *Azotobacter* juga menghasilkan enzim katalase dan enzim reduktase (Nath dan Ray, 2015). Enzim tersebut berfungsi untuk memecah zat berbahaya yang masuk ke sel bakteri serta menurunkan kadar toksisitas suatu pencemar utamanya logam berat. Selain itu, mekanisme bioakumulasi yang terjadi di dalam sel bakteri berhubungan dengan adanya operon sesuai dengan logam yang diakumulasi (Silver, 1996).

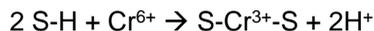
Tidak jauh berbeda dengan *Chlorella vulgaris*, proses yang terjadi dalam melakukan removal terhadap logam berat melibatkan mekanisme biosorpsi, biotransformasi, dan bioakumulasi. Imani et.al. (2011) menyatakan bahwa faktor kunci remediasi logam adalah bahwa logam bersifat non-biodegradable akan tetapi dapat melakukan transformasi melalui proses sorpsi, metilasi, kompleksasi, serta mengubah nilai valensinya. Menurut Droste pada tahun 2007, saat ion logam berat tersebar di sekitar sel, maka ion tersebut akan terikat pada elemen yang terdapat pada dinding sel berdasarkan kemampuan daya affinitas kimia yang dimiliki sel tersebut.

Menurut Purnamawati, et.al (2015), sebelum ion logam sampai ke membran sel dan sitoplasma sel, ion logam tersebut harus melalui dinding sel mikroalga yang mengandung

berbagai macam variasi polisakarida dan protein dan memiliki sejumlah sisi aktif yang mampu berikatan dengan ion logam. Pada dinding sel, akan terjadi pertukaran ion monovalen dan divalen seperti Na, Mg, dan Ca yang kemudian akan digantikan oleh ion-ion logam berat untuk selanjutnya membentuk formasi kompleks antara ion-ion logam berat dengan kelompok fungsional seperti karbonil, amino, thiol, hidroksi, fosfat dan hidroksi-karboksil. Proses inilah yang disebut sebagai biosorpsi.

Adapun proses biosorpsi tersebut berlangsung cepat dan bolak-balik serta dapat terjadi baik pada sel mati maupun sel hidup. Proses ini berlangsung efektif dengan kehadiran pH tertentu dan kehadiran ion-ion lainnya dimana logam berat dapat menjadi garam tak larut yang diendapkan (Tortora, 2001 ; Glick and Pasternak, 2001). Oleh karena itulah dinding sel sering disebut sebagai bagian terpenting dari mekanisme pertahanan sel karena dinding sel merupakan penghalang pertama terhadap akumulasi logam berat yang bersifat toksik.

Menurut Esmaeili (2015), *Chlorella vulgaris* dapat mensintesis protein pengkelat logam melalui proses aktif menggunakan Glutathione. Glutathione ini ada dalam seluruh sel. Jika terjadi pencemaran logam Cr misalnya glutathione akan membentuk fitokelatin-Cr selanjutnya diteruskan ke vakuola (Haryoto dan Agustono, 2004). Penyerapan logam Cr berkaitan dengan pH medium :



S-H = permukaan adsorben / gugus thiol pada fitokelatin  
(Dasta & Tabati, 1992 dalam Haryoto & Agustono, 2004)

Menurut Purnamawati, et.al (2015), akumulasi Cr akan meningkatkan konsentrasi ion H<sup>+</sup>. Oleh karena reaksi kesetimbangan maka kenaikan pH medium menyebabkan reaksi bergeser ke produksi ion H<sup>+</sup> yang artinya makin banyak

jumlah logam Cr yang terkomplekskan. Karena harga konstanta laju pelepasan logam lebih kecil dibandingkan dengan laju penyerapannya, maka ion logam akan cenderung menetap di dalam sel. Proses penyerapan dan akumulasi bahan toksik dalam sel akan dipecah dan diekskresikan, disimpan atau dimetabolisme oleh organisme, tergantung konsentrasi dan potensial kimia dari bahan tersebut.

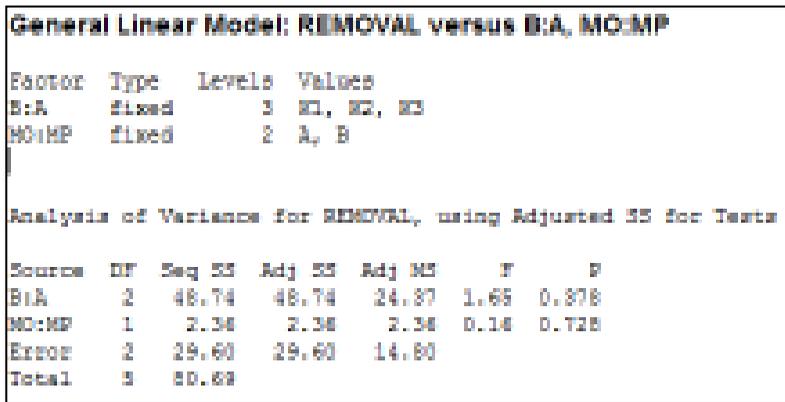
Pada dasarnya kedua mikroorganisme baik *Azotobacter* S8 dan *Chlorella vulgaris* melakukan penyisihan kromium melalui proses yang sama yakni biosorpsi, biotransformasi / biomineralisasi, dan bioakumulasi. Letak interaksinya berasal dari kebutuhan ketersediaan oksigen yang merupakan sumber energi utama bagi bakteri. Menurut Mujtaba dan Lee pada tahun 2016, proses interaksi konsorsium antara bakteri dan mikroalga terjadi melalui pertukaran  $O_2$ - $CO_2$ . Karbondioksida yang dihasilkan oleh respirasi *Azotobacter* S8 diperlukan untuk proses fotosintesis *Chlorella vulgaris*. Sedangkan sebaliknya, hasil oksigen dari proses fotosintesis akan digunakan oleh *Azotobacter* S8 untuk melakukan metabolisme. Hal ini ditunjukkan oleh bukti bahwa pada campuran 50% *Chlorella vulgaris* dengan 50% *Azotobacter* S8 memberikan hasil dekonsentrasi kromium paling tinggi. Jika merujuk pada data hasil penelitian, sebenarnya pemeran utama atau penentu removal adalah bakteri *Azotobacter* S8. Hal ini didasarkan pada kecepatan laju pertumbuhan kedua mikroorganisme, yang mana bakteri mengalami pertumbuhan lebih cepat daripada mikroalga dan masih terukur hingga akhir masa uji.

Disisi lain, penelitian yang dilakukan oleh Ali, et.al (2015) menunjukkan bahwa penambahan *Azotobacter* pada lingkungan perairan mengandung *Chlorella vulgaris* diketahui mampu meningkatkan jumlah sel *Chlorella vulgaris*. Hal ini disebabkan oleh kemampuan bakteri *Azotobacter* untuk menghasilkan berbagai phytohormones dan vitamin (Fukami et al., 1997). *Azotobacter* yang merupakan bakteri fiksasi nitrogen

dapat memberikan pemenuhan kebutuhan nitrogen sebagai nutrisi yang diperlukan oleh *Chlorella vulgaris* (Ali, et.al, 2015).

#### 4.3.2 Uji Statistik

Uji statistik dilakukan dengan metode ANOVA. Anova atau Analysis of Variance merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata dari dua sampel atau kelompok (dalam penelitian ini adalah variabel penelitian) (Sirait, 2001). Uji ini dilakukan untuk mengetahui variabel mana yang memiliki lebih berpengaruh terhadap hasil dekonsentrasi kromium. Uji ANOVA menggunakan software Minitab 16. Hasil uji ANOVA terhadap 2 variabel yakni komposisi bakteri dan mikroalga serta komposisi mikroorganisme dengan media pencemar ditunjukkan pada gambar berikut.



```
General Linear Model: REMOVAL versus B:A, MO:MP
Factor Type Levels Values
B:A fixed 3 01, 02, 03
MO:MP fixed 2 A, B

Analysis of Variance for REMOVAL, using Adjusted SS for Tests

Source DF Seq SS Adj SS Adj MS F P
B:A 2 48.74 48.74 24.37 1.65 0.878
MO:MP 1 2.38 2.38 2.38 0.16 0.728
Error 2 29.60 29.60 14.80
Total 5 80.69
```

**Gambar 4. 29 Hasil Uji ANOVA Pada Kedua Variabel**

Hasil menunjukkan bahwa nilai P-value yang dihasilkan oleh kedua variabel adalah  $>0,05$  yang berarti kedua variabel tidak memiliki pengaruh terhadap hasil dekonsentrasi kromium. Adapun hasil grouping juga menunjukkan bahwa kedua variabel tidak dalam grup yang berbeda. Ini menunjukkan bahwa

berapapun nilai variabel tersebut berubah, tidak akan mempengaruhi hasil nilai dekonsentrasi kromium.

```
Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence
BiA  N  Mean  Grouping
K2   2  17.0  A
K3   2  11.8  A
K1   2  10.4  A

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence
M0iMP  N  Mean  Grouping
B       3  11.7  A
A       3  12.5  A

Means that do not share a letter are significantly different.
```

**Gambar 4. 30 Hasil Grouping Kedua Variabel**

Hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor. Menurut Gumilang dan Hermana (2013) HRAP merupakan kombinasi dari kolam oksidasi dan reaktor alga yang didesain untuk mencapai dua tujuan yaitu pengolahan sekunder air limbah dan produksi biomassa alga. Sistem ini bekerja dengan memanfaatkan simbiosis mutualisme antara alga dengan bakteri aerob, dimana alga menyediakan oksigen yang dibutuhkan oleh bakteri untuk mendegradasi bahan organik, dan bakteri menghasilkan karbondioksida dan senyawa mineral yang merupakan nutrisi bagi alga (Araki et al., 2001).

Pendekatan termodinamika yang dilakukan oleh Oron et al. (1979) mengindikasikan bahwa diperlukan hampir 300 unit bakteri untuk memenuhi kebutuhan karbondioksida per unit alga, nilai ini terjadi pada kondisi ideal. Sedangkan pada prakteknya rasio antara alga dan bakteri pada sistem HRAP adalah 1:250, dan sumber karbondioksida alternatif mungkin diperlukan untuk menjaga sistem termodinamikanya tetap seimbang. Pemenuhan ketersediaan karbondioksida alternatif pada HRAP skala

laboratorium atau HRAR yang digunakan pada penelitian ini berasal dari pengadukan menggunakan paddle. Kebutuhan energi yang cukup besar mengakibatkan kecepatan pengadukan tiap reaktor tidak bisa sama.

Menurut Garcia et.al (2000) menyebutkan bahwa kinerja simbiosis alga-bakteri pada sistem HRAR dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti kadar oksigen terlarut, intensitas cahaya, toksisitas substrat, waktu retensi, kedalaman penetrasi cahaya dan kekeruhan air limbah. Hal-hal tersebutlah yang memungkinkan tidak adanya pengaruh antara variabel yang digunakan terhadap hasil dekonsentrasi kromium. Karena faktor-faktor tersebut juga dapat mempengaruhi kinerja biosorpsi yang dilakukan oleh kedua mikroorganisme.

#### **4.3.3 Potensi Bahan Bakar Alternatif**

Pada era modern ini, bahan bakar minyak (BBM) telah menjadi kebutuhan utama masyarakat Indonesia. Hal ini ditunjukkan dari tren peningkatan kebutuhan bahan bakar minyak tiap tahunnya yang selalu mengalami peningkatan. Tercatat pada rentang tahun 2000-2014, konsumsi BBM di Indonesia naik seiring meningkatnya laju pertumbuhan ekonomi dan penambahan penduduk. Rerata peningkatan konsumsi BBM selama rentang waktu tersebut adalah 1.74% dan 1.76%. Namun produksi minyak mentah di Indonesia terus menurun setiap tahunnya pada periode tersebut. Rata-rata penurunan terjadi sekitar 4.07% setiap tahunnya. (Sa'adah, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan BBM suatu saat nanti akan tidak lagi relevan dengan kondisi masa yang akan datang. Untuk menghemat impor BBM khususnya bahan bakar solar, strategi yang dilakukan Pemerintah saat ini yaitu dengan mewajibkan peningkatan pemanfaatan biodiesel di sektor transportasi, industri, komersial dan pembangkit listrik ( Peraturan Menteri ESDM Nomor 25 Tahun 2013 tentang Perubahan atas Peraturan Menteri ESDM Nomor 32 Tahun 28 tentang

Penyediaan, Pemanfaatan, dan Tata Niaga BBN (Biofuel) ). Tentunya upaya ini harus didukung dengan mempertimbangkan peningkatan produksi biodiesel dalam negeri (Jumiarni, 2018).

Menjawab kebutuhan BBM yang besar dimasa datang diperlukan diversifikasi energi dengan mengoptimalkan pemanfaatan sumber daya alam yang dimiliki oleh bangsa Indonesia. Mikroalga saat ini dipandang sebagai bahan baku baru yang berpotensi menghasilkan minyak dengan jumlah yang cukup besar. Akan tetapi, hingga saat ini minyak alga sebagai bahan baku alternatif pembuatan biodiesel masih sebatas wacana yang perlu dikaji dan ditelaah secara mendalam untuk selanjutnya dapat dikembangkan menjadi bahan baku alternatif pembuatan biodiesel (Rachmaniah, et.al, 2010).

Menurut Christi (2007), mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik yang mampu mengkonversi cahaya matahari, air dan karbondioksida menjadi biomassa. Dalam biomassa mikroalga terkandung bahan-bahan penting yang bermanfaat, seperti protein, karbohidrat, lipid dan asam nukleat (Borowitzka, 1998). Berbagai macam penelitian telah mengemukakan bahwa banyak spesies mikroalga yang mengandung lipid dengan kadar tinggi, bahkan mencapai 90% (Amaro et al., 2011). Kandungan lipid dalam mikroalga inilah yang nantinya dapat dikonversi lebih lanjut menjadi biodiesel (Chisti, 2007).

Salah satu jenis mikroalga yang saat ini tengah digencarkan adalah *Chlorella* sp. Kemampuan tumbuh *Chlorella* sp pada lingkungan tercemar dikarenakan sel mikroalga tersebut memiliki phytohormon dan polyamine untuk dapat beradaptasi pada ekosistem air yang tercemar dengan logam berat (Niczyporuk, et.al, 2012). Kemampuan *Chlorella* sp dalam menyerap logam berat ini didukung dengan kemampuan beradaptasi, bertumbuh dan juga memiliki nilai ekonomis untuk dijadikan agen remediasi pada lingkungan tercemar. Selain dapat digunakan juga untuk bioremediasi logam berat mikroalga

*Chlorella* sp juga dapat digunakan untuk sebagai prekursor biodiesel karena mengandung 10-48% lemak (Mata, et.al, 2010). Peneliti lain melaporkan bahwa spesies *Chlorella ellipsoidea* memiliki kandungan lipid 32% – 43 % (Abou – Shanab et al., 2011 ; Yang et al., 2011) dan *Chlorella vulgaris* sebesar 56,6% (Liu et al., 2008).

Pada penelitian ini, hasil terbaik dari dekonsentrasi kromium diuji nilai kalor bakarnya melalui uji bom kalorimeter guna mengetahui potensi awal ketersediaan bahan bakar alternatif pada biomassa yang dihasilkan. Pada uji ini, biomassa yang dipakai berasal dari reaktor K2A yang memiliki persentase dekonsentrasi terbaik. Reaktor K2A berisi campuran bakteri *Azotobacter* S8 dan *Chlorella vulgaris* sebesar 50%:50% dengan jumlah inokulum awal yang ditambahkan sebesar 5%. Biomassa yang terbentuk disaring dan dikeringkan di oven dengan suhu 105°C selama 24 jam. Perbandingan yang digunakan adalah biomassa *Chlorella vulgaris* murni yang diambil dari stok mikroalga.



(a)



(b)

**Gambar 4. 31 (a) Biomassa Kering Hasil Reaktor dan (b) Biomassa Kering *Chlorella vulgaris* Hasil Stok**

Hasil uji bom kalorimeter menunjukkan hasil nilai kalor pada biomassa reaktor sebesar 4.435,10 kkal/kg. Sedangkan pada biomassa stok sebesar 4.360,50 kkal/kg. Ternyata hasil

biomassa reaktor yang merupakan campuran antara bakteri *Azotobacter S8* dan *Chlorella vulgaris* memiliki nilai kalor bakar yang lebih besar daripada *Chlorella vulgaris* murni. Hal ini tentunya menjadi temuan baru bahwa biomassa hasil dari penyisihan logam berat memiliki potensi yang lebih baik untuk dijadikan sebagai bahan bakar alternatif.

Jika dibandingkan dengan kalor bakar solar yang merupakan fraksi terdekat dengan biodiesel yakni sebesar 9536,8 kal/gr (Aziz, 2008), angka tersebut masih terlalu jauh yaitu setengah di bawah kalor bakar solar. Hal ini dikarenakan sampel pengujian yang dilakukan merupakan pelet atau biomassa kering. Untuk dapat mencapai angka yang lebih tinggi, kandungan minyak yang terdapat pada biomassa harus diekstrak terlebih dahulu. Kemudian dilakukan reaksi transesterifikasi untuk memecah molekul rantai panjang yang dihasilkan dari trigliserida menjadi gliserol. Penambahan methanol dengan katalis KOH akan membentuk minyak tersebut menjadi metyl ester atau yang dikenal dengan biodiesel (Widyastuti dan Dewi, 2014). Proses transesterifikasi tersebut akan meningkatkan kalor bakar biomassa.

Oleh karena sampel yang diujikan merupakan biomassa kering, maka pembanding yang paling tepat adalah biobriket. Dari hasil pengujian, diketahui nilai kalor bakar biomassa kering hasil penyisihan kromium lebih tinggi dari briket arang sekam sebesar 3520 kal/gr (Riseanggara, 2008) dan mendekati nilai kalor bakar briket bungkil biji jarak sebesar 4553 kal/gr (Wahyuni, 2008). Meskipun belum dapat dipastikan, namun nilai kalor bakar yang dihasilkan dari biomassa kering hasil penyisihan logam berat kromium tersebut dapat menjadi dasar penelitian lanjutan terkait dengan kandungan bahan bakar minyak alternatif untuk mengatasi krisis energi di muka bumi.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hasil Uji MIC pada bakteri *Azotobacter* S8 dan Uji RFT pada mikroalga *Chlorella vulgaris* menunjukkan hasil yang sama yaitu kedua mikroorganisme tersebut memiliki toleransi terhadap logam berat kromium pada konsentrasi 17 mg/L.
2. Persentase penyisihan logam berat kromium oleh konsorsium bakteri *Azotobacter* S8 dan mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan berbagai variasi campuran yakni 10,57% pada konsorsium 25% *Azotobacter* S8 dengan 75% *Chlorella vulgaris* pada penambahan inokulum awal 5%; 10,31% pada konsorsium 25% *Azotobacter* S8 dengan 75% *Chlorella vulgaris* pada penambahan inokulum awal 10%; 18,68% pada konsorsium 50% *Azotobacter* S8 dengan 50% *Chlorella vulgaris* pada penambahan inokulum awal 5%; 15,41% pada konsorsium 50% *Azotobacter* S8 dengan 50% *Chlorella vulgaris* pada penambahan inokulum awal 10%; 8,14% pada konsorsium 75% *Azotobacter* S8 dengan 25% *Chlorella vulgaris* pada penambahan inokulum awal 5%; dan 15,43% pada konsorsium 75% *Azotobacter* S8 dengan 25% *Chlorella vulgaris* pada penambahan inokulum awal 10%.
3. Komposisi terbaik konsorsium bakteri *Azotobacter* S8 dan mikrolaga *Chlorella vulgaris* dalam proses remediasi logam berat kromium berada pada variasi 50% bakteri dan 50% mikroalga dengan rasio inokulum : media sebesar 5% : 95% berdasarkan hasil penurunan total kromium yakni sebesar 18,68%.

## 5.2 Saran

Adapun saran yang dapat kami sampaikan untuk penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut :

1. Dilakukan penambahan nutrisi untuk bakteri di dalam reaktor untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri dalam konsorsium.
2. Pada penelitian selanjutnya, variabel yang digunakan dapat diganti menjadi variasi jenis ataupun jumlah nutrisi.
3. Penggunaan media selektif Ashby's Mannitol Agar supaya bakteri yang terukur pada uji parameter koloni bakteri benar-benar merupakan bakteri dari spesies *Azotobacter S8*.
4. Dilakukan analisis berat kering biomassa yang terbentuk untuk mengetahui akumulasi logam kromium dalam sel mikroorganisme konsorsium.
5. Pada penelitian prekursor biodiesel selanjutnya, dapat dilakukan ekstraksi minyak pada biomassa yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Hamid, M.S., Elbaz, A.F., Ragab, A.A., Hamza, H.A., dan El-Halafawy, K.A. (2010). Identification and Characterization of Azotobacter chroococcum Isolated From Some Egyptian Soils. **Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology**, 1(2) : 93-104.
- Abdulla, H.M., Kamal, E.M., Mohamed, A.H., dan El-Bassuony, A.D. (2010). Chromium Removal from Tannery Wastewater Using Chemical and Biological Techniques Aiming Zero Discharge of Pollution. **Proceeding of Fifth Scientific Environmental Conference. Zagazig-UNI**. 171-183
- Abou-Shanab, R.A.I., Hwang, J.H., Cho, Y., Min, B., Jeon, B.H. (2011). Characterization of Microalgal Species Isolated from Fresh Water Bodies as a Potential Source for Biodiesel Production. **Applied Energy**, 88 : 3300 – 3306.
- Afifah, A.S. dan Hermana, J. 2013. Efek Aerasi dan Konsentrasi Substrat Pada Laju Pertumbuhan Alga Menggunakan Sistem Bioreaktor Proses Batch. **Jurnal Teknik Pomits**, 2(1) : 1-5.
- Ahemad, M. (2012). Implications of Bacterial Resistance Against Heavy Metals in Bioremediation : A Review. **IIOAB Journal**, 3(3): 39-46.
- Akhter, M.S., Hossain, S.J., Hossain, S.A., dan Datta, R.K. (2012). Isolation and characterization of salinity tolerant Azotobacter sp. **Greener Journal of Biological Sciences**, 2 : 043-051.
- Ali, S.M., Wafa, M.I.A., dan Abbas, W.T. (2011). Evaluation of Azotobacter and Azospirillum biofertilizers as a probiotics in Oreochromis niloticus aquaculture. **J. Fish. Aqua. Sci**, 6 : 535-544.
- Ali, S.M., Nasr, H.S., Abbas, M.T. (2015). Using Diazotrophic Bacteria for Biomass Production of Microalgae. **Egyptian Journal of Environmental Research**, 3 : 41-52.

- Anderson, R.A. 2005. **Algal Culturing Techniques**. China : Elsevier Academic Press, pp. 242-249.
- Anggraeni, T.D. 2016. **Teknik Kultur Nitzschia sp. Dari Skala Laboratorium Sampai Skala Intermediet di Balai Budidaya Perikanan Air Payau (BPBAP) Situbondo**. Laporan Praktik Kerja Lapangan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga.
- Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X. (2011). Advances and Perspectives in Using Microalgae to Produce Biodiesel. **Applied Energy**, 88 : 3402 – 3410.
- Araki, S, Martin-Gomez, S., Becares, E., DeLuis-Calabuig, E., dan Rojo-Vazquez, F. (2001). Effect of HRAPs on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocyst. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67(7) : 3322-3324.
- Arnata, I.W., Gunam, I.B.W., Anggreni, A.A.M.D., Aryanta, W.R., dan Loberto, P.M. 2013. **Produksi Biomassa dan Potensi Nutrisi Mikroalga Nannochloropsis sp. K4**. [Tesis]. Universitas Udayana : Teknologi Industri Pertanian.
- APHA, AWWA, WPCF. 2012. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater : The 22<sup>nd</sup> Edition**. Washington DC. : APHA, AWWA, WPCF.
- Aquilanti, L., Favilli, F., dan Clementi, F. (2004). Comparison of Different Strategies for Isolation and Preliminary Identification of *Azotobacter* from Soil Samples. **Journal of Soil Biology and Biochemistry**, 36 : 1475-1483.
- Aziz, I. (2008). Pembuatan Biodiesel dari Minyak Goreng Bekas Dalam Reaktor Tangki Alir Berpengaduk. **Valensi**, 1(2) : 100-108.
- Balamurugan, D., Udayasooriyar C., Kamaldevi B. (2014). Chromium (VI) Reduction by *Pseudomonas putida* and *Azotobacter S8* Isolated from Contaminated Soils. **International Journal of Environmental Sciences**, 5(3): 522-529.
- Benazier, J. Fathima, R. Suganthi, D. Rajvel, M. Padmini Pooja dan B. Mathithumilan. (2010). Bioremediation of Chromium in Tannery Effluent by Microbial Consortia.

- African Journal of Biotechnology**, 9(21): 3140-3143.
- Borowitzka, M.A. 1988. **Algal Growth Media And Sources Of Algal Cultures**. In : Borowitzka, M.A & L.J Borowitzka (Eds) **Microalga Biotechnology**. Cambridge University Press: Cambridge. pp. 456-465.
- Bosma R., dan Wijffels R. H. (2003). Marine Biotechnology in Education: A Competitive Approach. **Biomol Eng**, 20(4-6) : 125-31.
- Brady, D., Letebele, B., Duncan, J.R., Rose, P.D. (1994). Bioaccumulation of metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella* Algae. **Water SA**, 20: 213–218.
- Brock, T. D. & Madigan, M.T. 1991. **Biology of Microorganisms Sixth Edition**. New Jersey : Prentice-Hall International Inc.
- Buckle, K.A., Edwards R.A., Fleet G.H., & Wooton M.. 1986. **Ilmu Pangan**. Terjemahan : H. Purnomo & Adiono. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Carpa, R., dan Lucian B. (2011). Investigation of The Poly-*B*-Hydroxybutyrate (Phb) Producing in Mountain 52 Bacterial Strains by Transmission Electron Microscopy. **Romanian Biotechnological Letters**, 16(2): 5989 – 5995.
- CCAP. 2002. **Walne"s Medium for Algal Cultures**. Media Recipes Culture. Collection of Algae and Protozoa. Dunstaffnage Marine Laboratory. United Kingdom.
- Cervantes, C., Garcia, J.C., Devars, S., Corona, F.G., Tavera, H.L., Guzman, J.C.T., dan Sanchez, R.M. (2001). Interactions of Chromium With Microorganism and Plants. **FEMS Microbiology Review**, (25): 335-347.
- Champenois J, Marfaing H, Pierre R. (2014). Review of The Taxonomic Revision of *Chlorella* and Consequences for its Food Uses in Europe. **Journal of Applied Phycology**, (27): 1845–1851.
- Cheng, G., Li, X. (2009). Bioreduction of Chromium (VI) By *Bacillus* Sp. Isolated from Soilsof Iron Mineral Area. **Journal of Soil Biology**, 45(5): 483 – 487.

- Cheung, K.H. dan Gu, J. (2007). Mechanism of Hexavalent Chromium Detoxification by Microorganisms and Bioremediation Application Potential : A Review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 59(1): 8-15.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. **Biotechnology Advances**, 25 : 294 – 306.
- Chu, S.P. (1947). Note on The Technique of Making Bacteria-Free Cultures of Making Diatoms. **Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom**, (26): 296-302.
- Coma, V. (2013). Overview: Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant properties. **Polimeros**, 23 (3) : 287-297.
- Cromar, N.J. dan Fallowfield, H.J. (1997). Effect of Nutrient Loading and Retention Time on Performance of High Rate Algal Pond. **Journal of Applied Phycology**, 9(4): 301-309.
- David, Drs. dan Orcutt P. 2016. **Algae Culture for Freshwater Mussel Propagation**. USA : U.S. Fish Wildlife Service National Conservation and Training Center.
- Deepali. (2011). Bioremediation of Chromium (VI) From Textile Industry's Effluent and Contaminated Soil Using *Pseudomonas putida*. **Journal of Energy and Environment**, 2 (1): 24-31.
- De La Noue J., dan De Pauw N. (1988). The potential of microalgae biotechnology. A review of production and use of microalgae. **Journal of Biotechnology Advance**, 6 : 725-760.
- Dhal, B., Thatoi, H.N., Das, N.N., dan Pandey, B.D. (2013). Chemical and Microbial Remediation of Hexavalent Chromium from Contaminated Soil and Mining/Metallurgical Solid Waste : A Review. **Journal of Hazardous Materials**, (250): 272-291.
- Droste, R. 2007. **Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment**. John Wiley and Sons. New York. USA.
- Dwipayana, dan Ariesyady, H.D. 2010. **Identifikasi Keberagaman Bakteri pada Lumpur Hasil**

- Pengolahan Limbah Cat dengan Teknik Konvensional.** Program Studi Teknik Lingkungan, ITB, Bandung.
- Effendi, H. 2003. **Telaah Kualitas Air : Bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan IPB.** Bogor : Kanisius
- Erni, dan Hindersah, R. (2011). Biosorpsi Kadmium Dan Komposisi Eksopolisakarida Azotobacter Sp Pada Dua Konsentrasi CdCl<sub>2</sub>. **Agrinimal**, 1(1): 33 – 37.
- Ervin, Sandiah, N., dan Malesi, L. (2016). Identifikasi Bakteri Azospirillum dan Azotobacter Pada Rhizosfer Asal Komba-Komba (*Chromolaena odorata*). **JITRO**, 3(2) : 30-38.
- Esmaeili, L. 2015. **Bioaccumulation and Toxic Effect of Zinc on The Green Alga Chlorella vulgaris.** Thesis Universite Du Quebec A Montreal.
- Evelyne, R.J., dan Ravisankar, V. (2014). Bioremediation of Chromium Contamination- a Review. **International Journal of Research In Earth & Environmental Sciences**, 1(6): 20–26.
- Farombi, E.O., Adelowo, O.A., dan Ajimoko, Y.R. (2007). Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research Public Health**, 4(2): 158-5.
- Fogg, G. E. 1975. **Algae Culture and Phytoplankton Ecology Second Edition.** Maddison : University of Winconsin Press.
- Fogg, G. E. dan Thake, B. 1987. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology 3<sup>rd</sup> ed.** Wisconsin : The University of Wisconsin Press.
- Frank, C. L. 1995. **Toksikologi Dasar Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko.** Edisi II, Penerjemah Edi Nugroho, 358. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Fukami, K., Nishijima, T., dan Ishida, Y. (1997). Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. **Hydrobiologia**, 358: 185-191.

- Gallego, A.L.R. dan Salamanca, E.J.P. (2015). Interaction Alga-Bacteria Consortia : A New Application of Heavy Metals Bioremediations. **Journal Phytoremediations : Management of Environmental Contaminants**, (2): 63-73.
- Garcia, J., Mujeriego, R. dan Marine, M.H. (2000). High Rate Algal Pond Operating Strategis for Urban Wastewater Nitrogen Penyisihan. **Journal of Applied Phycology**, 12(3): 331-339.
- Garg, S.K. dan Bhatnagar, A. (1999). Effect of Azospirillum and Azotobacter inoculation on pond productivity and fish growth under fresh water conditions. **Indian J. Microbial**, 39 : 227-233.
- Gaudy, A.F. dan Gaudy, E.T. 1980. **Microbiology for Environmental Scientist and Engineers**. Mc.Graw-Hil Blook Company NewYork.
- Glick, B., dan Pasternak. 2001. **Molecular Biotechnology**. ASM Press. Washington DC. USA
- Goldman dan Horne .1983. **Limnology**. McGraw-Hill, Inc. Auckland.
- Graumann, P. 2007. **Bacillus : Cellular and Molecular Biology**. United Kingdom : Caister Academic Press.
- Gumilang, R. dan Hermana, J. (2013). Kajian Pengaruh Penambahan Bakteri Terhadap Kinerja High Rate Algae Reactor (HRAR) Untuk Mengolah Air Limbah Domestik. **Prosiding Seminar Nasional Manajemen Teknologi XVIII, D-1-1 s.d. D-1-6, ISBN : 978-602-97491-7-5**.
- Haddad, H. H. (2012). The Effect of Heavy Metals Cadimium, Chromium and Iron Accumulation in Human Eyes. **American Journal of Analytical Chemistry**, 3(10): 710–713.
- Hamdiyati, Y. 2011. **Pertumbuhan dan Pengendalian Mikroorganisme II**. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Haryoto, dan Agustono, W. (2004). Kinetika Bioakumulasi Logam Berat Kadmium oleh Fitoplankton Chlorella sp Lingkungan Perairan Laut. **Jurnal Penelitian Sains & Teknologi**, 5(2) : 89-103.

- Haug, A., Larsen, B., dan Smidsrod, O. (1967). Studies on sequence of uronic acid residues in alginic acid. **Acta Chemical Scand**, 21 : 691–704.
- Hladka, J.D. (1971). A Comparison of Growth Rate of Algae as Influenced by Variation in Nitrogen Nutrition in *Chorella pyrenoidosa* dan *Scenedesmus obliquus*. **Biologia Plantarum**, 13: 1-11.
- Holleman, A.F., Wiberg, E., Wiberg, N. 1985. **Chromium**. Lehrbuch der Anorganischen Chemie (dalam bahasa German) (edisi ke-91–100). Walter de Gruyter. hlm. 1081–1095. ISBN 3-11-007511-3.
- Hossain, Kamal., Hasan, M., Parvin, M.N., Hasan, M., Islam, S., Haque, A. (2012). Antimicrobial, Cytotoxic and Thrombolytic Activity of *Cassia senna* Leaves (Family : Fabaceae). **Journal of Applien Pharmaceutical Science**, (6): 186-190.
- Imani, S, Rezael-Zarchi, S., Zand, A.M., Abarg.Hashemi, H.B., Boma, H., Javid, A., dan Abarghouei, H.B. (2011). Hg, Cd and Pb Heavy Metal Bioremediation by *Dunaliella* Alga. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(13) : 2775-2780.
- Imron, M.F dan Purwanti, I.F. (2016). Uji Kemampuan Bakteri *Azotobacter* S8 dan *Azotobacter* S8 untuk Menyisihkan Trivalent Chromium ( $Cr^{3+}$ ) pada Limbah Cair. **Jurnal Teknik ITS**, 5(1).
- Inungaray, Carrillo, M.L., Morales, M.H., Rodríguez-Jimenes, G.d. C., García-Alvarado, M.Á., Ramírez-Lepe, M., Munguía, A.R., Robles-Olvera, V. (2014). Effect of Temperature, pH and Water Activity on *Penicillium digitatum* Growth. **Journal of Applied Mathematics and Physics**, 2 : 930-937
- Irfiansyah, M.R. 2015. **Teknik Kultur *Chlorella* sp. Skala Massal Untuk Pakan Rotifera sp. dan Starter Tambak di BBPBAP Jepara, Jawa Tengah**. Laporan Praktik Kerja Lapangan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. **Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton Pakan Alami 2**

- untuk Pembenihan Organisme Laut.** Yogyakarta : Kanisius.
- Iyer, A., Mody, K., dan Jha, B. (2005). Biosorption of Heavy Metals by a Marine Bacterium. **Pollution Bulletin**, 50 : 340-343.
- Jumiarni, D. (2018). Kultur Mikroalga Dari Rawa Gambut : Studi Pendahuluan Potensi Mikroalga Sebagai Bahan Baku Biodiesel. **Jurnal Biologi dan Pembelajarannya**, 13(1) : 47-56.
- Kamaludeen, S.P.B., Arunkumar, K.R., Avudainayagam, S., dan Ramasamy, K. (2003). Bioremediation of Chromium Contaminated Environments. **Journal of Experimental Biology**, 41(9): 972-985.
- Kantar, C., Cetin, Z., dan Demiray, H. (2008). In situ stabilization of chromium(VI) in polluted soil using organic ligands: The role of galacturonic, glucuronic and alginic acids. **Journal of Hazardous Materials**, 159 : 287-293.
- Kaur, H.R. dan Kumar, A. (2014). Bioremediation of Hexavalent Chromium in Wastewater Effluent by *Pseudomonas putida* (MTCC 102). **Journal of Research in Earth & Environmental Sciences**, 1(4): 18-24.
- Kawaroe, M., Prartono, T., Sannuddin, A., Sari, D. W., & Augustine, D. 2010. **Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar.** Bogor: IPB Press.
- Kizilkaya, R. (2009). Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. **Journal Environmental Biology**, 30: 1-18.
- Kotaś, J. dan Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution**, 107(3): 263–283.
- Krisanti M. 2003. **Peran Zeolit Sebagai Substrat Dan Penyedia Unsur Hara Bagi Mikroalga.** [Tesis]. Bogor : Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Krohn-Molt, I., Wemheuer, B., Alawi, M., Poehlein, A., Gullert, S., Schmeisser, C., Pommerening-Roser, A., Grundhoff,

- A., Daniel, R., Hanelt, D., dan Streit, W.R. (2013). Metagenome Survey of Multispecies and Alga-Associated Biofilm Revealed Key Elements of Bacterial-Algal Interactions in Photobioreactors. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, 79(20) : 6196-6206.
- Kurniawan, S.B., dan Purwanti, I.F.. 2016. **Uji Kemampuan Bakteri Azotobacter S8 dan Pseudomonas Putida Untuk Menyisihkan Trivalent Chromium (Cr<sup>3+</sup>) Pada Limbah Cair**. Tugas Akhir Jurusan Teknik Lingkungan ITS, 1-1/TA'2016, 1877.
- Kusuma, R.W.A. dan Zulaika, E. (2014). Potensi Chlorella sp. sebagai Bioakumulator Logam Cadmium. **Jurnal POMITS**, 3(2).
- Lay B.W. dan Hastowo, S. 1992. **Mikrobiologi**. Jakarta : Rajawali Press.
- Lenart, A. (2012). Occurance, characteristics, and genetic diversity of Azotobacter chroococum in various soils of Shotern Poland. **Poland Journal Environmental Study**, 21: 415-424.
- Leroi, F., Fall, P.A., Pilet, M.F., Chevalier, F., dan Baron, R. (2012). Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of Brochothrix thermosphacta and a bioprotective bacteria Lactococcus piscium CNCM I-4031. **Food Microbiology**, 31(2): 222 – 228.
- Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Xu Y., Tao, N., Peng, F., dan Wong, M. (2013). Efficiency Assesment and pH Effect in Removing Nitrogen and Phosporus by Algae-Bacteria Combined System of Chlorella vulgaris and Bacillus licheniformis. **Journal Chemosphere**, (92): 1383-1389.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris. **Bioresource Technology**, 99 : 4717–4722.
- Loehr. R. C. 1974. **Agricultural Waste Management: Problem, Process, and Approach**. New York : Academic Press.

- Machmud, M. (2001). Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. **Buletin AgroBio**, 4(1): 24-32.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., dan Parker, J. 2000. **Brock Biology of Microorganisms 9<sup>th</sup> ed.** Upper Saddle River, New Jersey : Prentice Hall.
- Maligan, J.M., Widayanti, V.T., dan Zubaidah, E. (2015). Identifikasi Senyawa Antimikroba Ekstrak Mikroalga Laut Tetraselmis chunii (Kajian Metode Ekstraksi Maserasi, Jenis Pelarut, dan Waktu Ekstraksi. **Jurnal Teknologi Pertanian**, 16(3): 195-206.
- Man K. L., Yusoff, M. I., Uemura, Y., dan Wei, J. (2016). Cultivation of *Chlorella vulgaris* Using Nutriens Source from Domestic Wastewater for Biodiesel Production: Growth Condition and Kinetic Studies. **Renewable Energy**, (103): 197-207.
- Mara, D. 2003. **Domestic Wastewater Treatment**. London : Earthscan.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14 (1): 217-232.
- Mouget, J.-L., Dakhama, A., Lavoie, M.C., dan de la Noüe, J. (1995). Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved?. **FEMS Microbiol Ecol**, 18 : 35–43.
- Mujtaba, G., & Lee, K. (2016). Advanced Treatment of Wastewater Using Symbiotic Co-culture of Microalgae and Bacteria. **Applied Chemistry for Engineering**, 27(1): 1–9.
- Munoz, R., Alvarez, M.T., Munoz, A., Terrazas, E., Guieysse, B., dan Mattiasson, B. (2006). Sequential Removal of Heavy Metals Ions and Organic Pollutans Using an Algal-Bacterial Consortium. **Journal Chemosphere**, (63): 903-911.
- Muslimin, L.W. 1996. **Mikrobiologi Lingkungan**. Jakarta : UNHAS.
- Mythili, K. dan Karthikeyan, B. (2011). Bioremediation of Cr (VI) from Tannery Effluent Using *Bacillus* spp and

- Staphylococcus spp. **International Multidisciplinary Research Journal**, 1(6): 38-41.
- Nacorda, J.O.O., Martinez-Goss, M.R., dan Torreta, N.K. (2010). Bioremoval and Bioreduction of Chromium (VI) by the Green Microalga, *Chlorella vulgaris* Beij., Isolated from Laguna de Bay, Philippines. **Phillipine Journal of Science**, 139(2): 181-188.
- Nath, J., dan Ray, L. (2015). Biosorption of Malachite Green from Aqueous Solution by Dry Cells of *Bacillus cereus* M1 16 (MTCC 5521). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 3(1): 386 – 394
- Niczyporuk, A. P., Bajguz, A., Zambrzycka, E., dan Żyłkiewicz, G. B. (2012). Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, (52): 52 – 65.
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B., dan Pandian, S.K. (2011). Assessment and Characterization of Heavy Metal Resistance in Palk Bay Sediment Bacteria. **Marine Environmental Research**, 71 : 283 - 294.
- Noctor, G., dan Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49 : 249-279.
- Oron, G., Shelef, G., Levi, A., Meydan, A., dan Azov, Y. (1979), Algae/Bacteria Ratio in High Rate Algae Ponds Used for Waste Treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, 38(4) : 570-576.
- Oswald, W.J. dan Golueke, C.G. 1965. Algae Production from Waste. **Proceedings of The 18<sup>th</sup> Annual California Animal Industrial Conference, Fresno-California**.
- Oves, M., Khan, M.S., dan Zaidi, A. (2013). Chromium Reducing and Plant Growth Promoting Novel Strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 Enhance Chickpea Growth in Chromium Amended Soils. **European Journal of Soil Biology**, 56(1): 72-83.
- Pavel, L.V., Diaconu, M., dan Gavrilescu, M. (2012). Studies of Toxicity of Chromium(VI) and Cadmium(II) on Some

- Microbial Species. **International Symposium on Biosorption and Bioremediation. Romania.**
- Pelczar, J. M. dan Chan, E.C.S. 1986. **Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid I.** Diterjemahkan oleh Ratna Siri Hadioetomo. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 492/MENKES/PER/IV/2010 tentang Persyaratan Kualitas Air Minum.
- Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2014 tentang Baku Mutu Air Limbah.
- Prabowo, D.A. 2009. **Optimasi Pengembangan Media Untuk Pertumbuhan Chlorella sp. Pada Skala Laboratorium.** Skripsi Program Studi Ilmu dan Teknologi Kelautan, IPB.
- Presscot, H. 2002. **Laboratory Exercise in Microbiology : The Fifth Edition.** New York : The McGraw-Hills Companies.
- Prihantini, N.B., Putri, B., dan Yuniati, R. (2005). Pertumbuhan Chlorella spp. dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. **MAKARA, SAINS**, 9(1) : 2.
- Priyadarshani, I., dan Sahu, D.R.B. (2012). Microalgal Bioremediation: Current Practices and Perspectives. **Journal of Biochemical Technology**, 3(3): 299–304.
- Polka, J.K. dan Silver, P.A. (2014). Induced Sensitivity of Azotobacter S8 Colony Morphology to Mechanical Media Compression. **PeerJ**, 2 : e597.
- Puente, M.E., Holguin, G., Glick, B.R., dan Bashan, Y. (1999). Root surface colonization of black mangrove seedlings by Azospirillum halopraeferans and Azospirillum brasilense in seawater. **FEMS Microbial. Ecol.**, 29: 283-292.
- Purnamawati, F.S., Tri, R.S., dan Munifatul, I. (2015). Potensi Chlorella vulgaris Beijerinck Dalam Remediasi Logam Berat Pb dan Cd Skala Laboratorium. **Jurnal Bioma**, 16(2): 102-113.
- Purwanti, I.F., Abdullah, S.R.S., Hamzah, A., Idris, M., Basri, H., Mukhlisin, M., dan Latif, M.T. (2015). Biodegradation of Diesel by Bacteria Isolated from Scirpus

- mucronatus Rizhosphere in Diesel-Contaminated Sand. **Journal of Advanced Science**, 2 (1): 140-143.
- Purwoko, T. 2007 **Fisiologi Mikroba**. Jakarta : Bumi Aksara.
- Rachmaniah, dkk. 2010. Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari *Chlorella* sp. Dan Prediksinya sebagai Biodiesel. **Seminar Teknik Kimia Soehadi Reksowardojo. Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Kampus ITS, Sukolilo, Surabaya**, 15(2): 27 – 31.
- Rama, P., dan Rai, J.P.N. (2009). Phytochelatins: Peptides Involved in Heavy Metal Detoxification. **Appl Biochem Biotechnol**, 160 : 945-963.
- Ramaraj, R., Unpaprom, Y., dan Dussadee, N. (2014). Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification. **International Journal of New Technology and Research (IJNTR)** 3 (2): 117-122.
- Redfield, A.C. 1934. **On the Proportions of Organic Derivatives in Sea Water and Their Relation to The Composition of Plankton**. Liverpool University Press, Liverpool, p. 176–192.
- \_\_\_\_\_. 1958. The Biological Control of Chemical Factors in The Environment. **Am Sci** **46:205–221**.
- Rehman, A. dan Shakoori, A.R. 2004. Tolerance and Uptake of Cadmium and Nickel by *Chlorella* sp., Isolated from Tannery Effluents. **Pakistan Journal Zoological**, 36(4) : 327-331.
- Richmond, R. E. (1986). Microagriculture. **CRC-Critical Reviews in Biotechnology**, IV(4) : 369 – 438.
- Riseanggara, R.R. 2008. **Optimasi Kadar Perekat Pada Briket Limbah Biomassa**. Skripsi Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.
- Riyono, S.H. (2006). Beberapa Metode Pengukuran Klorofil Fitoplankton di Laut. **Jurnal Oseana**, 31(3): 33-44.
- Rose, P.D., Boshoff, G.A., Van Hille, R.P., Wallace, L.C.M., Dunn, K.M., dan Duncan, J.R. (1998). An Integrated Algal Sulphate Reducing High Rate Ponding Process for The Treatment of Acid Mine Drainage Wastewaters. **Journal Biodegradation**, (9): 247–57.

- Rosmarkam, A., dan Yuwono, N.W. 2002. **Ilmu Kesuburan Tanah**. Yogyakarta : Kanisius.
- Rostini, I. 2007. **Kultur Fitoplankton (Chlorella sp. dan Tetraselmis chuii) pada Skala Laboratorium**. Jatinangor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran.
- Sa'adah, A.F. 2016. **Analisis Penyediaan dan Konsumsi Bahan Bakar Minyak Indonesia**. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Saavedra, M., dan Voltolina, D. (2005). The Growth Rate, Biomass, Production, and Composition of *Chaetoceros* sp. Grown with Different Light Sources. **Journal Aquaculture Engineering** (35): 161-165.
- Sachlan, M. 1982. **Planktonologi**. Semarang : Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Diponegoro.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., dan Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, (35): 265–278.
- Safita, A., dan Zulaika, E. (2015). Viabilitas *Azotobacter* A1a, A5, dan A9 pada Medium Terpapar Logam Berat Cr(VI). **Jurnal Sains dan Seni ITS**, 4(1) : 2337-3520.
- Safonova, E., Kvitko, K.V., Iankevitch, M.I., Surgko, L.F., Afti, I.A., dan Reisser, W. (2004). Biotreatment of Industrial Wastewater by Selected Algal-Bacteria Consortia. **Journal Engineering of Life Science**, (4): 347-353.
- Sarles, W.B., et.al. 1956. **Microbiology: General and Applied, Second Editon**. New York: Harper & Brothers.
- Sartika, D. 2010. Aktivitas Antioksidan Lipid Mengandung Pigmen dan Komposisi Kimia dari *Chlorella vulgaris* Pada Umur Panen Yang Berbeda. **Skripsi Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB**.
- Shahzad, I., Hussain, K., Nawaz, K., dan Nisar, M.F. (2010). Review algae as an alternative and renewable resource for biodiesel production. *The Biol. (E-Journal of Life Sciences*, 1(1) : 16–23.

- Shelef, G., Meydan, A., Moraine, R., Sandbank, A., Levi, A., dan Assi, J. (1975). Combined System for Algal Wastewater and Reclamation and Protein Production. **Sherman Environmental Engineering Research Center, Haifa, Israel.**
- Shrivastava, A., Singh, V., Jadon, S., dan Bhadauria, S. (2013). Heavy Metal Tolerance of Three different Bacteria Isolated from Industrial Effluent. **International Journal of Pharmaceutical Research and Bioscience**, 2(2): 137 – 147
- Silver, S. (1996). Bacterial Resistance to Toxic Metal Ions - A Review. **Gene**, 179 : 9-19.
- Sirait, A.M. (2001). Analisa Varians (ANOVA) Dalam Penelitian Kesehatan. **Media Litbang Kesehatan**, IX(2) : 39-43.
- Smith, T.J., Blackman, S.A., dan Foster, S.J. (2000). Autolysins of *Azotobacter S8* : Multiple Enzymes with Multiple Function. **Journal of Microbiology**, 146: 249-262.
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., dan Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Journal Biotechnology Advances**, 29(6): 896–907.
- Suminten, N.K., Sudiarta, I.W., dan Simpen, I.N. (2014). Adsorpsi Ion Logam Cr(III) pada Silika Gel dari Abu Sekam Padi Termodifikasi Ligan Difenilkarbazon (Si-DPZon). **Jurnal Kimia**, 8(2): 231-236.
- Sundar, K., Sadiq, I.M., Mukherjee, A., dan Chandrasekaran, N. (2011). Bioremoval of Trivalent Chromium Using *Bacillus* Biofilms Through Continous Flow Reactor. **Journal of Hazardous Materials**, 196(1): 44-5.
- Suriawiria, U. 1986. **Pengantar Mikrobiologi Umum**. Bandung : Angkasa.
- \_\_\_\_\_. 1990. **Pengantar Mikroba Umum**. Bandung : Angkasa.
- Syed Shabudeen, P.S., Indhumathi, P., Shoba, U.S., dan Saraswathy, C.P. (2014). The Removal of Chromium from Aqueous Solution by Using Green Micro Algae. **Journal Chemistry Pharmacy Research**, 6(6): 799-808.

- Sze P. 1993. **Abiology of The Algae**. Wm. C. Brown Communication. Inc. Georgetown University. United States of America.
- Tadjudda, M. 2005. **Analisis Daerah Penangkapan Ikan Cakalang (*Kotsuwonus pelami*) dan Madidihiang (*Thunnus albacares*) dengan Menggunakan Data Satelit di Perairan Kabupaten Wakatobi Sulawesi Tenggara**. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Takagi, M., Karseno, dan Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **J. Biosci. Bioeng.**, 101: 223–226.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., dan Simpson, C.G. (1998). Removal of Copper by Free and Immobilized Microalga, *Chlorella vulgaris*. **Journal Wastewater Treatment with Algae**, (2): 17-36.
- Taw. 1990. **Petunjuk Kultur Murni dan Massal Mikroalga**. UNDP. FAO.
- Tjahjo, W., Erwati, L., dan Hanung, S. 2002. **Budidaya Phytoplankton & Zooplankton**. Lampung : Balai Budidaya Laut Lampung.
- Tortora, G.J. 2001. **Microbiology an Introduction. 7th ed**. World Student Series. San Francisco. USA.
- Triatmojo, A., dan Tangahu, B.V. 2017. **Pengaruh Intensitas dan Durasi Paparan Cahaya Light-Emitting Diodes (LEDs) Pada Sistem High Rate Algal Reactor Dalam Pengolahan Limbah Cair Laundry**. Tugas Akhir Jurusan Teknik Lingkungan ITS.
- Tripathy, P.P., dan Ayyappan, S. (2005). Evaluation of *Azotobacter* and *Azospirillum* as biofertilizers in aquaculture. **World J. Microbial. Biotechnol.**, 21:1339-1343.
- Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 9 Tahun 1985 tentang Perikanan.
- USEPA. 1987. **Guidelines for The Culture of Fathead Minnows *Pimephales Promelas* for Use in Toxicity Tests, EPA/600/3-87/001**. Duluth, Minnesota : USEPA.

- \_\_\_\_\_. 2010. **IRIS, Toxicological Review of Hexavalent Chromium (2010 External Review Draft)**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC EPA/635/R- 10/004A, 2010.
- Wahyuni, A.T. 2008. **Pemanfaatan Bungkil Biji Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) Sebagai Bahan Bakar Biomassa (Briket) Menggunakan Perekat Tapioka dan Gaplek**. Departemen Teknologi Industri Pertanian, IPB.
- Widayat, dan Hadiyanto. 2015. Pemanfaatan limbah cair industri tahu untuk produksi biomassa mikroalga *Nannochloropsis* sp. sebagai bahan baku biodiesel. **Reaktor**, 15 : 253 - 260.
- Widyastuti, C.R., dan Dewi, A.C. (2014). Sintesis Biodiesel dari Minyak Mikroalga *Chlorella vulgaris* Dengan Reaksi Transesterifikasi Menggunakan Katalis KOH. **Jurnal Bahan Alam Terbarukan**, 3(1) : 35-41.
- Wirosaputro, S. 2002. **Chlorella, Untuk Kesehatan Global, Teknik Budidaya dan Pengolahan**. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- World Health Organization. 1988. **International Programme on Chemical Safety : Environmental Health Criteria 61 (Chromium)**.
- Yazid, M. (2007). Kajian Pemanfaatan Bakteri Hasil Isolasi Sebagai Agen Bioremediasi Radionuklida Uranium Di Lingkungan. **Prosiding PPI – PDIPTN 2007**, Yogyakarta.
- Zheng, Z., Li, Y., Zhang, X., Liu, P., Ren, J., Wu, G., Zhang, Y., Chen, Y., dan Li, X. (2015). A *Azotobacter* S8 Strain Can Reduce Hexavalent Chromium to Trivalent and an *Nfra* Gene is Involved. **International Journal of Biodeterioration & Biodegradation**, 97(1): 90-96.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

## LAMPIRAN A. PEMBUATAN REAGEN DAN PROSEDUR ANALISIS

### Lampiran A.1. Tahapan Pembuatan Media NA (Nutrient Agar)

#### a. Alat dan Bahan

##### 1. Alat

- Tabung reaksi
- Beaker glass 100 mL , 250 mL, dan 1 L
- Spatula
- Neraca Analitik
- Autoclave
- Kipas lemak dan kasa
- Kertas minyak tahan panas
- Karet gelang

##### 2. Bahan

- Bubuk media NA
- Aquadest

#### b. Langkah Kerja

1. Metode diambil dari The 5<sup>th</sup> Edition : Laboratory Exercise in Microbiology oleh Harley Prescott tahun 2002 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
2. Media NA disiapkan dan ditimbang sesuai dengan kebutuhan pada neraca analitik. Jumlah media NA dihitung berdasarkan kebutuhan pada masing-masing kegiatan sebagai berikut :
  - Peremajaan Isolat Bakteri
    - Diperlukan 12 tabung reaksi dengan masing-masing tabung berisi 5 mL media NA
    - Perhitungan kebutuhan media NA :
      - Total media NA yang dibutuhkan = 12 x 5 mL = 60 mL
      - 100 mL media NA cair membutuhkan 2 gram NA bubuk (konsentrasi = 20 g/L), maka :
      - Massa NA yang dibutuhkan :  $\frac{60}{100} \text{ mL} \times 2 \text{ gr}/100\text{mL} = 1,2 \text{ gram}$

- Media NA yang telah ditimbang sesuai kebutuhan selanjutnya dilarutkan menggunakan aquades pada beaker glass 100 mL hingga batas volume 60 mL.
- Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
  - Diperlukan 8 tabung reaksi dengan 7 tabung berisi 5 mL media NA dan 1 tabung berisi 10 mL media NA.
  - Perhitungan kebutuhan media NA :
    - Total media NA yang dibutuhkan =  $8 \times 5 \text{ mL} = 40 \text{ mL}$
    - 100 mL media NA cair membutuhkan 2 gram NA bubuk (konsentrasi = 20 g/L), maka :
    - Massa NA yang dibutuhkan :  $\frac{40}{100} \text{ mL} \times 2 \text{ gr}/100\text{mL} = 0,8 \text{ gram}$
    - Karena pada uji MIC media NA akan dicampur dengan air limbah kromium sebanyak 5 mL (pengenceran hingga 2 kali), sehingga untuk mendapatkan konsentrasi yang tetap 20 g/L massa media NA yang diperlukan adalah
    - Massa NA yang dibutuhkan =  $0,8 \text{ gram} \times 2 = 1,6 \text{ gram}$
    - Media NA yang telah ditimbang sesuai kebutuhan selanjutnya dilarutkan menggunakan aquades pada beaker glass 100 mL hingga batas volume 40 mL.
- Uji Colony Forming Units (CFU)
  - Diperlukan 3 tabung reaksi berisi 10 mL media NA untuk setiap percobaan. Total media NA tiap percobaan  $3 \times 10 \text{ mL} = 30 \text{ mL}$
  - Total percobaan uji CFU pada penelitian ini adalah 84 percobaan (utama dan duplo)
  - Perhitungan kebutuhan media NA :

- Total media NA yang diperlukan untuk seluruh uji CFU adalah 30 mL x 84 percobaan = 2.520 mL = 2,6 L.
  - 100 mL media NA cair membutuhkan 2 gram NA bubuk (konsentrasi = 20 g/L), maka :
  - Total massa NA yang dibutuhkan :  $\frac{2600}{100} \text{ mL} \times 2 \text{ gr} = 52 \text{ gram}$
3. Media NA terlarut selanjutnya dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk menggunakan spatula.
  4. Setelah mendidih, media NA harus segera dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sesuai volume yang telah ditentukan. Tabung reaksi yang telah berisi media NA kemudian disumbat dengan kapas lemak.
  5. Seluruh tabung reaksi berisi media NA selanjutnya diikat menjadi satu menggunakan karet gelang dan diletakkan pada beaker glass 1 L. Beaker glass tersebut dibungkus dengan kertas minyak dan dimasukkan ke dalam autoclave untuk dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 1,1 kg/cm<sup>2</sup> selama 1-2 jam (APHA, 2012 ; Hossain, et.al, 2012 ; Presscot, 2002).
  6. Setelah selesai, keluarkan dari autoclave kemudian untuk media agar miring pada peremajaan isolat diletakkan pada posisi miring dengan mulut tabung lebih tinggi, biarkan hingga dingin dan memadat.
  7. Sisa media yang belum digunakan dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 1 – 4,4°C dan dapat digunakan untuk kebutuhan selanjutnya (APHA, 2012 ; Tam, et.al., 1998)

## Lampiran A.2. Tahapan Pembuatan Media NB (Nutrient Broth)

### a. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

- Beaker glass 1 L
- Erlenmeyer 250 mL dan 1000 mL
- Labu pengencer 1000 mL
- Spatula
- Neraca Analitik
- Autoclave
- Kapas lemak dan kasa
- Kertas minyak tahan panas
- Karet gelang

#### 2. Bahan

- Bubuk media NB
- Aquadest

### b. Langkah Kerja

1. Metode diambil dari The 5<sup>th</sup> Edition : Laboratory Exercise in Microbiology oleh Harley Prescott tahun 2002 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
2. Total media NB yang diperlukan adalah sebagai berikut :
  - Perlakuan Bakteri pada tahap Inokulasi Mikroorganisme ke media yang mengandung kromium
  - Setiap percobaan dibutuhkan 9 buah Erlenmeyer 250 mL yang berisi media NB masing-masing 200 mL dan 1 buah Erlenmeyer 1000 mL yang berisi media NB 1.700 mL.
  - Total kebutuhan NB pada seluruh percobaan adalah 3.500 mL.
3. Media NB disiapkan dan ditimbang sebanyak 8 gram menggunakan neraca analitik (konsentrasi 8 gr/L).
4. Setelah itu, bubuk NB dimasukkan ke dalam beaker glass 1000 mL dan dilarutkan menggunakan aquades hingga volume 1 L (takaran aquades menggunakan labu pengencer 1000 mL) serta diaduk dengan spatula kaca hingga seluruh bubuk NB larut.

5. Selanjutnya NB dalam beaker glass tersebut dituang ke masing-masing Erlenmeyer sesuai volume yang diperlukan. Ulangi langkah 3 dan 4 sampai volume yang diperlukan untuk percobaan telah mencukupi.
6. Erlenmeyer ditutup dengan kapas lemak kemudian dibungkus dengan kertas minyak dan diikat dengan karet gelang serapat mungkin.
7. Media NB yang telah siap dalam beaker glass selanjutnya harus segera disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1,1 kg/cm<sup>2</sup> selama 1-2 jam (APHA, 2012 ; Hossain, et.al, 2012 ; Presscot, 2002).
8. Setelah selesai, keluarkan dari autoclave kemudian siap untuk digunakan setelah suhunya berubah menjadi suhu kamar (25°C).
9. Sisa media yang belum digunakan dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 1 – 4,4°C dan dapat digunakan untuk kebutuhan selanjutnya (APHA, 2012 ; Tam, et.al., 1998)

### Lampiran A.3. Tahapan Pembuatan Air Salin 0,85 %

#### a. Alat dan Bahan

##### 1. Alat

- Beaker glass 1 L
- Erlenmeyer 1000 mL
- Tabung reaksi
- Labu pengencer 1000 mL
- Spatula
- Neraca Analitik
- Autoclave
- Aluminium foil
- Kapas lemak dan kasa
- Kertas minyak tahan panas
- Karet gelang

##### 2. Bahan

- Bubuk NaCl 0,85%
- Aquades

#### b. Langkah Kerja

1. Metode diambil dari The 5<sup>th</sup> Edition : Laboratory Exercise in Microbiology oleh Harley Prescott tahun 2002 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
2. Bubuk NaCl disiapkan dan ditimbang sebanyak 8,5 gram menggunakan neraca analitik (konsentrasi 8,5 gr/L).
3. Setelah itu, bubuk NaCl dimasukkan ke dalam beaker glass 1000 mL dan dilarutkan menggunakan aquades hingga volume 1 L serta diaduk dengan spatula kaca hingga homogen.
4. Jumlah pembuatan air salin disesuaikan dengan banyaknya kebutuhan.
5. Selanjutnya air salin dalam beaker glass tersebut dituangkan ke wadah yang diinginkan baik Erlenmeyer maupun tabung-tabung reaksi dengan volume sesuai dengan yang diperlukan.
6. Wadah ditutup dengan aluminium foil (untuk tabung reaksi) dan atau kapas lemak (untuk Erlenmeyer) kemudian dibungkus dengan kertas minyak dan diikat dengan karet gelang serapat mungkin.

7. Air salin yang telah siap dalam beaker glass selanjutnya disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1,1 kg/cm<sup>2</sup> selama 1-2 jam (APHA, 2012 ; Hossain, et.al, 2012 ; Presscot, 2002).
8. Sisa media yang belum digunakan dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 1 – 4,4°C dan dapat digunakan untuk kebutuhan selanjutnya (APHA, 2012 ; Tam, et.al., 1998)

## Lampiran A.4. Tahapan Pembuatan Larutan Stock Kromium

### a. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

- Beaker glass 2 L
- Labu pengencer 1000 mL
- Spatula
- Neraca Analitik
- Autoclave
- Aluminium foil
- Kertas minyak tahan panas
- Karet gelang

#### 2. Bahan

- Bubuk  $K_2Cr_2O_7$
- Air laut komersil

### b. Langkah Kerja

1. Metode diambil dari "The 22<sup>nd</sup> Edition : Standard Method for The Examination of Water and Wastewater" oleh APHA, AWWA, dan WPFC tahun 2012 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
2. Larutan stok kromium akan dibuat dengan bahan dasar bubuk  $K_2Cr_2O_7$  dengan konsentrasi 2000 mg/L  $Cr^{6+}$ .
3. Bubuk  $K_2Cr_2O_7$  disiapkan dan ditimbang menggunakan neraca analitik. Jumlah bubuk  $K_2Cr_2O_7$  yang digunakan dihitung terlebih dahulu dengan rumus sebagai berikut :  
1000 mg/L  $Cr^{6+}$

$$\begin{aligned} &= \frac{Mr Cr^{6+}}{Mr K_2Cr_2O_7} \times \frac{\text{Massa bubuk yang ditimbang}}{\text{Volume larutan}} \\ &= \frac{104}{294} \times \frac{\text{Massa bubuk yang ditimbang}}{1 L} \end{aligned}$$

Massa bubuk yang ditimbang

$$= \frac{294 \times 1 L \times 2000 \text{ mg/L}}{104} = 5.653.85 \text{ mg} = 5,65385 \text{ gram}$$

4. Setelah itu, bubuk  $K_2Cr_2O_7$  dimasukkan ke dalam beaker glass 2 L dan dilarutkan menggunakan air laut komersil hingga volume 2.000 mL (takaran air laut

menggunakan labu pengencer 1000 mL) serta diaduk dengan spatula kaca hingga homogen.

5. Jumlah pembuatan larutan stok disesuaikan dengan banyaknya kebutuhan.
6. Pindahkan larutan stok ke dalam wadah kaca yang cukup dan tertutup (dapat menggunakan botol bensin bekas yang telah dicuci bersih).

## Lampiran A.5. Tahapan Peremajaan Isolat Bakteri

- a. Alat dan Bahan
  1. Alat
    - Jarum ose
    - Pembakar bunsen
    - Kapas lemak dan kasa
    - Inkubator
  2. Bahan
    - Media NA miring steril
- b. Langkah Kerja
  1. Metode diambil dari The 5<sup>th</sup> Edition : Laboratory Exercise in Microbiology oleh Harley Prescott tahun 2002 dan Machmud tahun 2001 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
  2. Bakteri induk, media NA, dan seluruh peralatan yang diperlukan telah disiapkan sebelumnya.
  3. Ambil jarum ose dan panaskan ujungnya pada api bunsen hingga membara. Kemudian didinginkan sejenak dengan cara diangin-anginkan.
  4. Penutup tabung reaksi biakan induk dibuka kemudian mulut tabung dilewatkan pada api sebanyak 2 kali.
  5. Diambil satu ose bakteri induk dengan cara menggoreskan ujung ose pada bakteri induk di permukaan media NA.
  6. Setelah selesai, mulut tabung reaksi tersebut dilewatkan kembali pada api dan ditutup kembali menggunakan kapas lemak.
  7. Selanjutnya penutup tabung media agar miring dibuka, kemudian mulut tabung dilewatkan pada api bunsen sebanyak 2 kali.
  8. Jarum ose yang sudah mengandung bakteri selanjutnya dioleskan pada permukaan media agar miring NA secara zig-zag dimulai dari dasar tabung.
  9. Setelah selesai mulut tabung dilewatkan kembali pada api sebanyak 2 kali dan ditutup kembali menggunakan kapas lemak.
  10. Seluruh perlakuan 1-8 harus dilakukan secara aseptik yaitu dekat dengan api (maksimum 20 cm dari api).

11. Jarum ose yang telah digunakan selanjutnya dipanaskan kembali hingga membara pada api untuk membunuh sisa bakteri yang menempel.
12. Tabung media agar miring NA yang telah diinokulasi selanjutnya disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, bakteri siap digunakan untuk penelitian.

## Lampiran A.6. Tahapan Uji MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

### a. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

- Jarum ose
- Pembakar bunsen
- Cawan petri steril (plate disposable)
- Labu pengencer 25 mL
- Kertas
- Pemanas plate
- Pipet ukur 5 mL

#### 2. Bahan

- Media NA miring berisi bakteri berumur 24 jam
- Media NA steril 5 mL
- Larutan stok  $K_2Cr_2O_7$  dengan konsentrasi tertentu

### b. Langkah Kerja

1. Metode diambil dari The 5<sup>th</sup> Edition : Laboratory Exercise in Microbiology oleh Harley Prescott tahun 2002 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
2. Bakteri induk, media NA, larutan stok  $K_2Cr_2O_7$ , dan peralatan lain yang dibutuhkan telah disiapkan sebelumnya.
3. Larutan stok  $K_2Cr_2O_7$  dengan 5 konsentrasi yang telah ditentukan sebelumnya yakni 10, 25, 50, 100, dan 200 mg/L diambil masing-masing 5 mL. Sebelumnya larutan diencerkan dari larutan stok menggunakan labu pengencer 25 mL dengan pengambilan yang disesuaikan hitungan pengenceran berikut ini :

- Untuk konsentrasi 10 mg/L

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$M_1 \cdot 5 \text{ mL} = 10 \text{ mg/L} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$M_1 = \frac{10 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 10 \text{ mL}}{20 \text{ mg/L}} = 20 \text{ mg/L}$$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

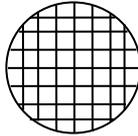
$$2000 \text{ mg/L} \cdot V_1 = 20 \text{ mg/L} \cdot 25 \text{ mL}$$

$$M_1 = \frac{20 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 25 \text{ mL}}{2000 \text{ mg/L}} = 0,25 \text{ mL}$$

Jadi, jumlah yang perlu diambil dari larutan stok kromium  $K_2Cr_2O_7$  adalah 0,25 mL yang diencerkan hingga 25 mL.

Dengan cara yang sama dapat dihitung kebutuhan untuk konsentrasi lainnya.

4. Larutan kromium hasil pengenceran tersebut telah disterilkan dengan autoclave sebelumnya untuk menghindari kontaminasi bakteri dan diletakkan pada tabung reaksi dengan disumbat kapas lemak.
5. Media NA steril dalam tabung reaksi yang masih padat masing-masing 5 tabung berisi 5 mL NA dan 1 tabung berisi 10 mL NA dipanaskan hingga mendidih dan mencair. Kemudian didiamkan hingga hangat namun tidak sampai kembali memadat.
6. Ambil 6 buah cawan petri steril.
7. Tutup cawan dibuka, masukkan 5 larutan stok 5 mL dengan konsentrasi masing-masing ke dalam 5 cawan petri kemudian masukkan media NA cair 5 mL ke masing-masing cawan. Kemudian masukkan 1 larutan stok 10 mL ke cawan petri terakhir.
8. Tutup kembali cawan petri dengan segera, kemudian homogenkan larutan di dalamnya dengan cara menggeser-geserkan cawan petri ke arah atas, bawah, kanan, kiri hingga larutan tercampur sempurna. Tunggu hingga media padat.
9. Setelah media NA padat kembali, diambil bakteri induk sebanyak 1 ose secara aseptik. Jarum ose sebelumnya disterilkan dengan membakarnya pada api Bunsen hingga membara.
10. Ose berisi bakteri selanjutnya diinokulasikan ke media NA yang telah padat secara zig-zag.
11. Setelah selesai, cawan selanjutnya disimpan di dalam inkubator selama 24 jam.
12. Dibuat kertas dengan ukuran sebesar cawan petri kemudian dibuat garis (grid) hingga membentuk beberapa area persegi berukuran 1 cm x 1 cm seperti gambar berikut :



13. Ambil cawan yang telah disimpan 24 jam kemudian tempelkan kertas bergambar tersebut pada belakang cawan.
14. Hitung luasan area media yang ditumbuhi bakteri dengan cara menghitung banyaknya area persegi pada kertas gambar yang tertutupi bakteri. Persegi yang dihitung yang ditumbuhi bakteri minimal 50% area persegi tersebut.
15. Hitung persentase luas permukaan pertumbuhan bakteri pada media setelah 24 jam dan 48 jam inkubasi dengan rumus sebagai berikut :
$$\text{Luas} = \frac{\text{Luas permukaan konsentrasi tertentu}}{\text{luas permukaan konsentrasi 0 mg/L}} \times 100\%$$
16. Luas terkecil yang didapat merupakan konsentrasi minimum kromium yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

## **Lampiran A.7. Tahapan Propagasi Mikroalga**

### **a. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

- Reaktor propagasi 3 L steril
- Laminar air flow
- Refrigerator / Lemari pendingin
- Plastik wrap
- Aerator dan selang aerator steril
- Mikropipet dan tip 1 mL dan 10 mL steril
- Erlenmeyer 1 L dan 2 L
- Gelas ukur 100 mL steril
- Kapas lemak dan kasa
- Kertas minyak
- Karet gelang

#### **2. Bahan**

- Biakan induk mikroalga *Chlorella vulgaris*
- Air laut komersil steril
- Pupuk Walne
- Vitamin

### **b. Langkah Kerja**

#### **a. Pembuatan larutan propagasi**

1. Air laut komersil disiapkan. Pada penelitian ini, penulis membeli air laut di tempat penjualan ikan hias di Surabaya.
2. Ambil air laut dan tuangkan ke dalam Erlenmeyer 1 L dan atau 2 L. Volume disesuaikan dengan kebutuhan.
3. Tutup Erlenmeyer dengan kapas lemak dan kertas minyak kemudian eratkan dengan karet gelang.
4. Larutan propagasi yang telah siap dalam selanjutnya disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 1,1 kg/cm<sup>2</sup> selama 2 jam (APHA, 2012 ; Presscot, 2002).
5. Setelah selesai, keluarkan dari autoclave kemudian siap untuk digunakan setelah suhunya berubah menjadi suhu kamar (25°C).

#### **b. Uji pertumbuhan mikroalga**

1. Biakan induk, larutan propagasi, dan peralatan steril yang diperlukan lainnya telah disiapkan sebelumnya.

2. Kultivasi mikroalga dilakukan dengan mencampurkan 30% kultur mikroalga ke dalam 70% media tumbuh (Isnansyoto dan Kurniastuti, 1995 ; Kawaroe et.al., 2010). Oleh karenanya, larutan propagasi yang diperlukan sebanyak 700 mL air laut steril dalam Erlenmeyer 1 L.
3. Diambil 300 mL biakan induk mikroalga menggunakan gelas ukur steril dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi air laut steril sebelumnya.
4. Ditambahkan pupuk Walne dan vitamin dengan konsentrasi masing-masing 1 ml/L menggunakan mikropipet 1 mL ke dalam Erlenmeyer tersebut (Isnansyoto dan Kurniastuti, 1995).
5. Kegiatan pencampuran tersebut (disebut inokulasi) dilakukan secara aseptik (Purnamawati, dkk, 2015 ; Maligan, dkk, 2015). Mulut Erlenmeyer harus dibakar pada api Bunsen setiap sebelum dan sesudah inokulasi dilakukan. Kegiatan dilakukan di dalam Laminar Air Flow dengan jarak maksimum 20 cm dari api Bunsen.
6. Setelah selesai, 1 buah selang aerator dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dengan posisi kapas lemak masih tertancap pada mulut Erlenmeyer.
7. Kultivasi dilakukan selama 7-14 hari (Arnata, dkk, 2013) dengan penambahan aerasi 24 jam, pencahayaan 6000-7000 Lux pada permukaan media dengan menggunakan lampu fluorescens (Maligan, dkk, 2015). Periode pencahayaan 12/12 (Liang, et.al., 2013 ; Nacorda, et.al., 2010) serta rentang suhu 25-27°C (Nacorda, et.al., 2010).
8. Dilakukan perhitungan jumlah sel mikroalga setiap 24 jam sesuai langkah pada lampiran A.11 mulai dari hari ke-0 hingga waktu kultivasi selesai. Kemudian hasil analisis diplotkan untuk mendapatkan kurva pertumbuhan mikroalga. Dari kurva tersebut akan didapatkan waktu fasa eksponensial dan munculnya second generation yang diperlukan untuk uji Range Finding Test dan uji penyisihan kromium.

c. Kultivasi Mikroalga

1. Kultivasi mikroalga bertujuan untuk memperbanyak biakan induk sehingga peneliti dapat memiliki cadangan stok biakan mikroalga (Anderson, 2005).
2. Kultivasi mikroalga dilakukan dengan mencampurkan 30% kultur mikroalga ke dalam 70% media tumbuh (Isnansyoto dan Kurniastuti, 1995 ; Kawaroe et.al., 2010)
3. Biakan induk, larutan propagasi, dan peralatan yang diperlukan lainnya telah disiapkan sebelumnya. Pada perbanyak stok ini, digunakan reaktor propagasi dengan kapasitas 3 L.
4. Reaktor propagasi diisi dengan air laut steril sebanyak 2.100 mL.
5. Diambil 900 mL biakan induk mikroalga menggunakan gelas ukur steril kemudian dimasukkan ke dalam reaktor yang telah berisi air laut steril sebelumnya.
6. Ditambahkan pupuk Walne dan vitamin dengan konsentrasi masing-masing 1 ml/L menggunakan mikropipet 10 mL ke dalam reaktor tersebut (Isnansyoto dan Kurniastuti, 1995).
7. Kegiatan pencampuran tersebut (disebut inokulasi) dilakukan secara aseptik (Purnamawati, dkk, 2015 ; Maligan, dkk, 2015). Kegiatan dilakukan di dalam Laminar Air Flow dengan jarak maksimum 20 cm dari api Bunsen.
8. Setelah selesai, 2 buah selang aerator dimasukkan ke dalam reaktor.
9. Kultivasi dilakukan hingga akhir fasa log / eksponensial mikroalga yang didapat dari kurva uji pertumbuhan di sub bagian sebelumnya. Kultivasi dilakukan dengan penambahan aerasi 24 jam, pencahayaan 6000-7000 Lux pada permukaan media dengan menggunakan lampu fluorescens (Maligan, dkk, 2015). Periode pencahayaan 12/12 (Liang, et.al., 2013 ; Nacorda, et.al., 2010) serta rentang suhu 25-27°C (Nacorda, et.al., 2010).

10. Setelah memasuki akhir fase log / eksponensial, mikroalga selanjutnya dipanen dan diletakkan dalam wadah botol plastik yang telah disterilkan sebelumnya.
11. Mulut botol berisi stok biakan diberi wrap untuk mencegah kontaminasi.
12. Simpan biakan tersebut pada lemari pendingin bersuhu 4°C dan biakan tersebut siap untuk digunakan pada penelitian selanjutnya (APHA, 2012 ; Tam, et.al., 1998).

## Lampiran A.8. Tahapan Uji RFT (Range Finding Test)

- a. Alat dan Bahan
  1. Alat
    - Labu erlenmeyer 250 mL
    - Rotary shaker
    - Mikropipet dan tip 1 mL dan 10 mL steril
    - Kapas lemak dan kasa
    - Kertas minyak
    - Karet gelang
  2. Bahan
    - Biakan mikroalga
    - Larutan stok  $K_2Cr_2O_7$  dengan konsentrasi tertentu
    - Air laut steril
    - Pupuk walne
    - Vitamin
- b. Langkah Kerja
  1. Biakan mikroalga yang merupakan second generation dan memasuki fase log / eksponensial dipanen (Syed Sabudeen P.S., et.al., 2014).
  2. Perbandingan inokulum dan media adalah 10%:90%. Total volume dalam Erlenmeyer maksimal hanya 200 mL agar tidak tumpah saat dilakukan shaker.
  3. Diencerkan larutan stok kromium 1000 mg/L menjadi 5 konsentrasi yakni 10, 25, 50, 100, dan 200 mg/L dengan volume 180 mL menggunakan rumus pengenceran.
  4. Tuangkan larutan stok kromium yang telah diencerkan sesuai konsentrasi masing-masing ke dalam 5 labu erlenmeyer yang telah berisi mikroalga. Untuk konsentrasi 0 mg/L digunakan air laut steril sebanyak 180 mL. Kemudian seluruh Erlenmeyer berisi media tumbuh tersebut disterilkan menggunakan autoclave.
  5. Selanjutnya dilakukan inokulasi biakan mikroalga yang telah memasuki setengah fase eksponensial sebanyak 20 mL menggunakan mikropipet ke dalam masing-masing media dalam Erlenmeyer yang telah disiapkan di point 4 secara aseptik.
  6. Ditambahkan pupuk Walne dan vitamin dengan konsentrasi masing-masing 1 ml/L menggunakan

mikropipet 1 mL ke dalam erlenmeyer tersebut (Isnansyto dan Kurniastuti, 1995). Pada penelitian ini dilakukan penambahan sebanyak 0,2 mL ke dalam masing-masing Erlenmeyer.

7. Pencahayaan diberikan terhadap 6 labu erlenmeyer menggunakan lampu fluorescent dengan intensitas 6000-7000 lux (Triatmojo dan Tangahu, 2017) dan periode pencahayaan 12/12 (Liang, et.al., 2013 ; Nacorda, et.al., 2010).
8. Labu erlenmeyer selanjutnya diletakkan di atas Rotary shaker dan dilakukan pengadukan dengan kecepatan 100 – 130 rpm (Kusuma dan Zulaika, 2014).
9. Uji RFT dilaksanakan selama 7 hari dan dilakukan perhitungan jumlah sel mikroalga pada hari ke 0, 4, dan 7 (Triatmojo dan Tangahu, 2017) sesuai dengan langkah pada lampiran A.11.
10. Seluruh langkah sedapat mungkin dilakukan secara aseptik. Setelah 7 hari, dilakukan analisis dari hasil perhitungan jumlah sel untuk mendapatkan nilai konsentrasi minimum yang dapat menghambat perkembangan mikroalga

## **Lampiran A.9. Tahapan Inokulasi Mikroorganisme ke media yang mengandung kromium (Penelitian Utama)**

- a. Perlakuan pada Bakteri
  1. Bakteri berumur 24 jam yang telah diinokulasikan di media agar miring NA diambil sebanyak 2 – 15 ose.
  2. Bakteri di ose dipindahkan ke dalam erlenmeyer bervolume 250 mL yang berisi media NB sebanyak 200 mL dan atau Erlenmeyer 1000 mL yang berisi media NB sebanyak 1700 mL (Deepali, 2011). Semakin banyak jumlah ose yang diinokulasikan akan semakin baik terutama jika media NB yang digunakan lebih dari 200 mL.
  3. Jika bakteri terlihat masih menggumpal, dilakukan pengadukan secara manual dengan cara menggoyang-goyangkan erlenmeyer.
  4. Erlenmeyer yang telah berisi bakteri dishaker setengah waktu eksponensial yang didapat dari uji pertumbuhan bakteri sebelumnya untuk menumbuhkan bakteri pada media cair NB.
  5. Setelah di shaker, diambil sebanyak 200 mL media NB yang telah ditumbuhi bakteri dan dituangkan pada tabung centrifuge steril.
  6. Dilakukan proses sentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 4000 rpm (Purwanti, et.al., 2015).
  7. Supernatan yang tidak berisi bakteri dibuang dari tabung centrifuge.
  8. Dilakukan pencucian bakteri dari media dengan menambahkan air salin 0,85% (NaCl) steril pada bakteri di dalam tabung centrifuge. Penambahan dilakukan secara cepat yang dalam hal ini hanya dilewatkan pada pelet bakteri endapan sebanyak 2 kali. Setelah itu ditambahkan air salin kembali hingga setengah volume tabung centrifuge dan dikocok hingga endapan pelet tersuspensi kembali dengan air salin.
  9. Hasil suspensi diletakkan dan dikumpulkan pada labu erlenmeyer steril.
  10. Diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm (Balamurugan, et.al., 2014).

11. Dilakukan trial and error absorbansi dengan menambahkan air salin steril pada bakteri hingga didapatkan nilai absorbansi sebesar 0,5 A (Purwanti, et.al., 2015).
  12. Bakteri yang telah dilakukan trial and error absorbansi selanjutnya dimasukkan ke dalam reaktor secara bersamaan dengan biakan mikroalga sesuai dengan perbandingan volume komposisi yang telah ditetapkan sebelumnya.
  13. Dipastikan bahwa volume media mengandung kromium adalah 90% dan 95% sesuai dengan variabel penelitian.
- b. Perlakuan pada Mikroalga
1. Biakan alga second generation yang sedang berada pada setengah waktu fase eksponensial di dalam reaktor propagasi diambil dengan menggunakan gelas ukur steril.
  2. Mikroalga tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam reaktor secara bersamaan dengan biakan bakteri sesuai dengan perbandingan volume komposisi yang telah ditetapkan sebelumnya.
- c. Uji Penyisihan Logam Kromium
1. Larutan kromium dengan konsentrasi yang telah ditentukan diencerkan kemudian dimasukkan ke reaktor penelitian sebanyak 90% dan atau 95% dari volume total dalam reaktor.
  2. Masukkan biakan bakteri dan mikroalga yang telah diberikan perlakuan sebelumnya ke dalam reaktor steril sesuai dengan komposisi volume yang telah ditetapkan sebelumnya. Sampel pada hari ke-0 diambil dan diuji parameter serta diuji konsentrasi logam kromium awal menggunakan metode AAS dengan memisahkan mikroorganisme dari air sampel melalui sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit.
  3. Uji penyisihan dilakukan selama 7 hari dengan pengadukan (Liang, et.al., 2013), pencahayaan 6000-7000 Lux (Triatmojo dan Tangahu, 2017) pada permukaan media dengan menggunakan lampu fluorescens (Maligan, dkk, 2015). Periode pencahayaan

- 12/12 (Liang, et.al., 2013 ; Nacorda, et.al., 2010) serta rentang suhu 25-27°C (Nacorda, et.al., 2010).
4. Dilakukan uji parameter jumlah sel mikroalga, pH, suhu, dan salinitas setiap 24 jam serta uji CFU pada hari ke-0, waktu setengah fase eksponensial, waktu fase eksponensial, hari ke-1, hari ke-4, dan hari ke-7 untuk melihat perkembangan mikroorganismenya di dalam reaktor (Safonova, et.al., 2004 ; Liang, et.al., 2014).
  5. Setelah 7 hari, diambil sampel secukupnya dan dilakukan uji konsentrasi logam kromium akhir menggunakan metode AAS dengan memisahkan mikroorganismenya dari air sampel melalui sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit.
  6. Mikroorganismenya pada reaktor dengan hasil penurunan kadar kromium paling maksimal ditimbang  $\pm 5$  gram untuk dilakukan uji bom kalorimetri sebagai acuan dalam menentukan potensi bioenergi yang dihasilkan untuk dapat dijadikan sebagai bahan bakar alternatif biodiesel.

## Lampiran A.10. Tahapan Analisis Chlorophyl A

- a. Pembuatan Reagen
  1. Larutan Magnesium karbonat jenuh
    - 1 gram bubuk  $MgCO_3$  diencerkan dengan aquadest hingga volumenya 100 mL
    - Aduk hingga larutan keruh dan biarkan mengendap
    - Bagian bening (supernatan) yang terbentuk adalah larutan Magnesium karbonat yang dipakai
  2. Larutan Aseton
    - Campurkan 10 mL larutan magnesium karbonat dengan 90 mL larutan aseton (pembuatan larutan magnesium karbonat + larutan aseton)
  3. Larutan HCl 0,1 N
    - Diambil 0,2 mL HCl pekat kemudian diencerkan dengan aquadest hingga 250 mL
- b. Alat yang diperlukan
  1. Spektrofotometer dan kuvet
  2. Beaker glass 100 mL
  3. Pipet ukur 10 mL
  4. Gelas ukur 25 mL
  5. Pipet tetes
- c. Langkah Kerja
  1. Metode diambil dari "The 22<sup>nd</sup> Edition : Standard Method for The Examination of Water and Wastewater" oleh APHA, AWWA, dan WPFC tahun 2012 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
  2. Diambil sampel sebanyak 15 mL dengan tabung centrifuge
  3. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit
  4. Supernatan bening yang terbentuk dibuang. Sisakan 0,5 – 2,5 mL untuk mencampur endapan/pelet mikroalga yang mengendap di dasar tabung centrifuge. Kocok hingga endapan mikroalga tersuspensi kembali. Catat volume akhir suspensi.
  5. Diambil suspensi mikroalga pada dasar tabung centrifuge dengan menggunakan pipet ukur
  6. Masukkan mikroalga tersebut ke dalam labu ukur 25 mL
  7. Tambahkan aseton 2 mL

8. Aduk selama 1 menit
9. Tambahkan aseton hingga volume menjadi 10 mL pada batas labu ukur. Tuangkan ke beaker glass 100 mL.
10. Disentrifugasi kembali dengan kecepatan 500 rpm selama 20 menit hingga didapat sampel yang siap diuji dengan spektrofotometri.
11. Supernatan bening (kuning – kehijauan) diambil dan dibaca dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 750 nm dan 664 nm. Kalibrasi spektrofotometer dengan larutan aseton.
12. Catat hasil pembacaan. Tuangkan kembali supernatan dari kuvet ke beaker glass.
13. Tambahkan 1-2 tetes larutan HCl 0,1 N ke dalam sampel. Homogenkan dengan menggoyang-goyangkan sampel.
14. Diambil sampel dan dibaca kembali dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm dan 665 nm. Catat hasil pembacaan.
15. Dihitung hasil pembacaan menggunakan rumus LORENZEN (1967) yang dijelaskan dalam (Riyono, 2006) dan (APHA, 2012) sebagai berikut :

$$\text{Klorofil a (mg/m}^3\text{)} = \frac{26,7 (664b - 665a) \times V_e}{V_s \times d}$$

Keterangan :

664 b = penyerapan pada panjang gelombang 664 nm sebelum penambahan asam dikurangi dengan panjang gelombang 750 nm

665 a = penyerapan pada panjang gelombang 665 nm setelah penambahan asam dikurangi dengan panjang gelombang 750 nm

$V_e$  = volume aseton sebagai ekstrak yang dicampurkan ke sampel (mL)

$V_s$  = volume sampel yang disentrifugasi (L)

$d$  = lebar kuvet, path-length (cm)

## **Lampiran A.11. Tahapan Perhitungan Jumlah Sel Mikroalga**

### **a. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

- Mikroskop
- Haemocytometer Nebauer Improved
- Deckglass
- Pipet tetes
- Labu pengencer
- Mikropipet dan tip
- Tissue

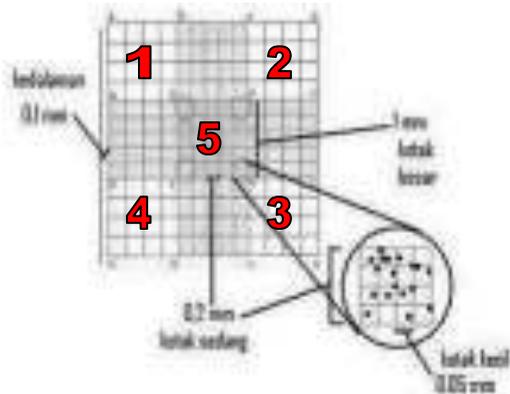
#### **2. Bahan**

- Alkohol 70%

### **b. Langkah Kerja**

1. Siapkan seluruh peralatan yang dibutuhkan.
2. Bersihkan permukaan Haemocytometer dan deckglass dengan menggunakan alkohol dan tissue
3. Ambil sampel dengan pipet tetes, teteskan pada permukaan kamar baca haemocytometer (kurang lebih 2 tetes)
4. Tutup sampel dengan deckglass secara cepat agar tidak terbentuk gelembung udara
5. Atur mikroskop pada perbesaran 100x (objektif x okuler), dan turunkan intensitas cahayanya ke mode yang paling rendah
6. Mulai dicari fokus mikroskop dengan menaikturunkan tubus hingga terlihat kamar-kamar baca. Kamar baca yang terlihat pada mikroskop adalah seperti gambar pada halaman berikutnya.
7. Apabila jumlah sel yang terlihat terlalu banyak dan susah untuk dilakukan perhitungan, maka sampel perlu diencerkan terlebih dahulu menggunakan labu pengencer. Catat jumlah pengenceran yang dilakukan (misal : sampel yang diambil ke labu pengencer sebanyak 1 mL, kemudian

diencerkan sampai batas pengencer 25 mL. Maka jumlah pengenceran yang dilakukan adalah 25 kali dan atau faktor pengencerannya adalah 25)



8. Pada gambar tersebut terdapat :
- Persegi Utama berukuran 3 mm x 3 mm. Persegi ini merupakan bidang baca keseluruhan.
  - Persegi besar terbagi menjadi 9 kotak besar berukuran 1 mm x 1 mm.
  - Empat kotak besar di masing-masing sudut persegi utama terbagi menjadi 16 kotak sedang berukuran 0,25 mm x 0,25 mm. Sedangkan satu kotak besar di pusat/tengah terbagi menjadi 25 kotak sedang berukuran 0,2 mm x 0,2 mm.
  - Khusus pada kotak sedang di tengah, terbagi kembali menjadi kotak-kotak kecil berukuran 0,05 mm x 0,05 mm.
  - Bidang hitung yang digunakan pada penelitian ini adalah 4 kotak besar disudut persegi utama dan 1 kotak besar di tengah (bertanda angka merah).
9. Hitung sel yang berada pada 5 kotak tersebut. Setelah didapat jumlah total sel pada 5 kotak, maka selanjutnya dapat dihitung kepadatan sel dengan rumus berikut :

$$\text{Kepadatan sel rata-rata} = \frac{\text{Jumlah Total Sel} : \text{Jumlah Kotak hitung}}{\text{Volume bidang}} \times \text{faktor pengenceran}$$

Volume bidang didapat dari luas bidang hitung dikalikan dengan kedalaman. Nilai kedalaman yang dimaksud sudah tertera pada Haemocytometer yang digunakan. Pada contoh bidang tersebut kedalaman bidang hitung sebesar 0,1 mm. Sedangkan luas bidang hitung yang digunakan adalah 1 mm x 1 mm = 1 mm<sup>2</sup>. Angka luasan tersebut sesuai dengan panjang dan lebar bidang hitung yang digunakan yakni kotak besar. Maka volume yang diperoleh sebesar :

$$\begin{aligned} \text{Volume} &= \text{Luas} \times \text{kedalaman} \\ &= 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \\ &= 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-1} \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3 \end{aligned}$$

1 cm<sup>3</sup> = 1 mL, maka Volume bidang hitung = 10<sup>-4</sup> mL

**Penting** : Volume bidang hitung dapat berubah sesuai dengan kotak yang digunakan sebagai bidang hitung.

## Lampiran A.12. Tahapan Uji CFU (Colony Forming Unit)

- a. Alat dan Bahan
  1. Alat
    - 1 botol sampling steril
    - 3 cawan petri steril
    - 3 tabung reaksi berisi agar tegak NA 10 mL
    - 4 tabung reaksi berisi 9 mL air fisiologis / air salin
    - Mikropipet dan tip 1 mL dan 0,1 mL steril
  2. Bahan
    - Media NA
    - Sampel air
    - Air fisiologis / air salin 8,5%
- b. Langkah Kerja
  1. Metode diambil dari The 5<sup>th</sup> Edition : Laboratory Exercise in Microbiology oleh Harley Prescott tahun 2002 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
  2. Semua alat dan bahan yang akan digunakan harus disterilkan terlebih dahulu kecuali sampel air.
  3. Ambil air sampel dengan menggunakan botol sampling steril minimal 5 mL.
  4. Cairkan media agar tegak dengan air panas dan dinginkan sampai suhu antara 42 – 45°C (media agar harus dalam keadaan cair tetapi tidak panas dan jangan sampai memadat kembali).
  5. Berikan label 4 tabung reaksi yang berisi 9 mL air salin steril dengan angka  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  dan cawan petri dengan angka  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$
  6. Lakukan semua prosedur dengan steril dan aseptik.
  7. Nyalakan api dengan pembakar bunsen. Lakukan semua prosedur di dekat nyala api maksimal 10 cm dari nyala api.
  8. Ambil air sampel dengan menggunakan pipet steril sebanyak 1 mL. Masukkan ke dalam tabung reaksi dengan label  $10^{-1}$  yang berisi air fisiologis 9 mL, kocok hingga homogen.
  9. Ambil air fisiologis pada tabung reaksi  $10^{-1}$  sebanyak 1 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi dengan label  $10^{-2}$ , kocok hingga homogen.

10. Ambil air fisiologis pada tabung reaksi  $10^{-2}$  sebanyak 1 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi dengan label  $10^{-3}$ , kocok hingga homogen.
11. Ambil air fisiologis pada tabung reaksi  $10^{-3}$  sebanyak 1 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi dengan label  $10^{-4}$ , kocok hingga homogen.
12. Kemudian ambil 0,1 mL dari tabung reaksi  $10^{-2}$  dan masukkan ke dalam cawan petri steril dengan label  $10^{-3}$ .
13. Ambil air fisiologis pada tabung reaksi  $10^{-3}$  sebanyak 1 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi dengan label  $10^{-4}$ , kocok hingga homogen.
14. Kemudian ambil 0,1 mL dari tabung reaksi  $10^{-4}$  dan masukkan ke dalam cawan petri steril dengan label  $10^{-5}$ .
15. Tuangkan agar tegak NA yang suhunya  $45^{\circ}\text{C}$  (pastikan NA tidak ada yang menggumpal) pada masing-masing cawan petri yang sudah berisi sampel dan campurkan dengan cara menggoyang-goyangkan masing-masing 5x ke arah depan-belakang, 5x ke arah kanan-kiri, 5x menurut arah putaran jarum jam, dan 5x menurut arah berlawanan jarum jam.
16. Tunggu hingga NA padat kembali. Setelah media NA padat kembali, balik cawan petri dan bungkus kembali dengan kertas minyak. Simpan pada inkubator selama 24 jam.
17. Setelah 24 jam dihitung jumlah koloni yang terbentuk menggunakan alat Bactery Colony Counter dan dimasukkan ke dalam rumus berikut :

Jumlah koloni (CFU/mL) =

$$\frac{\text{jumlah koloni tiap cawan}}{\text{mL sampel pada cawan}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

### **Lampiran A.13. Teknik Sterilisasi Alat dan Material**

- a. Sterilisasi reagen dan peralatan gelas
  1. Metode diambil dari “*The 22<sup>nd</sup> Edition : Standard Method for The Examination of Water and Wastewater*” oleh APHA, AWWA, dan WPFC tahun 2012 yang dimodifikasi sesuai eksperimen yang akan dilakukan.
  2. Isi bagian dasar autoclavedengan aquadest hingga batas tertentu
  3. Tutupkan sekat yang berlubang-lubang antara bagian dasar dan bagian atas autoclave.
  4. Masukkan bahan-bahan yang akan disterilkan. Bahan dan alat sebelumnya telah dibungkus dengan kertas minyak berwarna cokelat.
  5. Tutup autoclave tersebut dengan seksama dan serapat mungkin, aturlah pengaturan tekanan agar tekanan sesuai dengan yang diinginkan.
  6. Bukalah katup udara agar uap air dapat mengeluarkan udara yang ada di dalam autoclavepada saat pemanasan.
  7. Letakkan posisi power switch pada posisi on.
  8. Apabila suhu telah mencapai 100°C, tutuplah katup udara untuk meningkatkan tekanan uap di dalam autoclave.
  9. Perhatikan kenaikan suhu atau tekanan uap apabila telah mencapai 121°C atau tekanan 1,1 kg/cm<sup>2</sup>. Sterilisasi dihentikan 15 menit setelah suhu atau tekanan uap mencapai batas tersebut atau ± selama 60 menit pemanasan (Hossain, et.al, 2012) untuk bahan penelitian dan selama + 2 jam pemanasan (APHA, 2012) untuk alat penelitian.
  10. Untuk mengeluarkan bahan yang disterilkan :
    - a. Posisi power switch pada posisi off
    - b. Tunggulan hingga tekanan uap turun mendekati angka nol.
    - c. Bukalah katup udara.
    - d. Bukalah tutup autoclavedengan hati-hati agar uap tidak menyembur pada wajah/lengan.
  11. Keluarkan bahan-bahan yang disterilkan dari dalam autoclave.

- b. Sterilisasi peralatan non gelas
  - 1. Metode ini merujuk pada Isnansetyo dan Kurniastuty tahun 1995..
  - 2. Selang aerator, paddle pengaduk, disterilkan terlebih dahulu dengan direndam dalam larutan kaporit selama 10-15 menit.
  - 3. Kemudian dicuci bersih dan ditiriskan seperti peralatan gelas.
  - 4. Sebelum digunakan, semprot terlebih dahulu menggunakan alcohol 70%.
  
- c. Sterilisasi Laminar air flow
  - 1. Metode ini merujuk pada "*Algae Culture for Freshwater Mussel Propagation*" yang diterbitkan oleh U.S. Fish Wildlife Service National Conservation and Training Center tahun 2016.
  - 2. Bersihkan seluruh ruang kerja pada laminar air flow menggunakan alkohol 70%.
  - 3. Setelah bersih, nyalakan lampu UV dan blower selama 15 menit.
  - 4. Setelah steril, biarkan blower tetap menyala sedangkan lampu UV dimatikan. Kegiatan dapat dilakukan setelahnya.

## LAMPIRAN B. HASIL-HASIL PERHITUNGAN

### Lampiran B.1. Luas Permukaan Tumbuh Bakteri Pada Uji MIC

$$L = \frac{\text{Luas permukaan konsentrasi tertentu}}{\text{Luas permukaan konsentrasi nol}} \times 100\%$$

#### Luas Permukaan Bakteri Azotobacter S8 24 jam

0 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 27,3175 cm <sup>2</sup>	
17 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 17,5 cm <sup>2</sup>	= 64%
20 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 14,25 cm <sup>2</sup>	= 52,16%
30 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 8,625 cm <sup>2</sup>	= 31,6%
40 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 2,75 cm <sup>2</sup>	= 10,1%
42 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 1,875 cm <sup>2</sup>	= 6,86%
85 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 0 cm <sup>2</sup>	= 0%
169 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 0 cm <sup>2</sup>	= 0%
339 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 0 cm <sup>2</sup>	= 0%

#### Luas Permukaan Bakteri Azotobacter S8 48 jam

0 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 33 cm <sup>2</sup>	
17 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 22,5 cm <sup>2</sup>	= 68,2%
20 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 18,5 cm <sup>2</sup>	= 56,1%
30 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 11,125 cm <sup>2</sup>	= 33,7%
40 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 4,625 cm <sup>2</sup>	= 14%
42 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 2,6875 cm <sup>2</sup>	= 8,14%
85 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 0 cm <sup>2</sup>	= 0%
169 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 0 cm <sup>2</sup>	= 0%
339 mg/L K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	= 0 cm <sup>2</sup>	= 0%

**Lampiran B.2. Data Pengukuran pH, Suhu, Salinitas, Jumlah Sel Mikroalga, dan Log CFU Koloni Bakteri Pada Penelitian Pendahuluan dan Penelitian Utama**

**a. Penelitian Pendahuluan**

a. pH

Hari	pH		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
0	6.6	7.06	7.24
1	7.44	7.85	7.87
2	8.1	8.07	8.16
3	8.01	8.13	7.93
4	8.26	8.3	8.25
5	8.45	8.48	8.45
6	8.55	8.57	8.67
7	8.33	8.34	8.33
8	8.33	8.34	8.33
9	8.05	8.07	8.07
10	8.06	8.11	8.17

b. Suhu

Hari	Suhu (°C)		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
0	31.6	31.2	31
1	32	32	31.9
2	32.1	32.2	32.5
3	31.3	31	31
4	31.4	31.3	31.7
5	31	30.9	30.9
6	30.1	30	30.1

Hari	Suhu (°C)		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
7	30.5	30.5	30.3
8	30.5	30.5	30.3
9	31	31	31
10	31.5	31.7	31.5

c. Salinitas

Hari	Salinitas (psu)		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
0	33.8	34.9	35.3
1	32.9	37	32.8
2	35.3	38.2	37.9
3	36.4	38.2	37.6
4	37	37.7	38.5
5	37	39.6	39
6	42.1	40.5	39.9
7	37.8	40.6	39.7
8	37.8	40.6	39.7
9	38.5	43	40.2
10	41.5	44.1	40.9

d. Jumlah Sel Mikroalga

Hari	Jumlah Sel Mikroalga (sel/mL)		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
0	400000	1314000	984000
1	2248000	3354000	1722000
2	2546000	3904000	3958000
3	8026000	7000000	4016000

Hari	Jumlah Sel Mikroalga (sel/mL)		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
4	11150000	10900000	11140000
5	10100000	9928800	9640000
6	11040000	11380000	8600000
7	9940000	10740000	6100000
8	11640000	10180000	4660000
9	8020000	9420000	4300000
10	8900000	8040000	5040000

e. Klorofil A

Hari	Klorofil A (mg/m <sup>3</sup> )		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
0	33.82	169.1	627.45
1	270.56	1471.17	963.87
2	253.65	1153.44	1658.07
3	1335.89	1324.32	1615.35
4	4085.1	2354.94	1505.88
5	1441.8	1331.44	1297.62
6	11606.49	720.9	3027.78
7	4499.84	3444.3	427.2
8	1609.12	1594.88	441.44
9	526.88	1893.92	1011.04
10	412.96	1096.48	-1723.04

f. Optical Density

Hari	Optical Density (A)		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
0	0.04	0.098	0.091

Hari	Optical Density (A)		
	Chlorella 10%	Chlorella 20%	Chlorella 30%
1	0.106	0.215	0.133
2	0.216	0.257	0.246
3	0.332	0.308	0.273
4	0.377	0.468	0.29
5	0.429	0.48	0.393
6	0.544	0.611	0.526
7	0.626	0.63	0.568
8	0.747	0.708	0.51
9	0.967	0.847	0.536
10	0.998	0.779	0.376

## b. Penelitian Utama

### a. pH

pH							
Hari	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
0	7.01	7.10	7.12	7.00	6.88	6.90	7.07
0.17	7.06	7.36	7.33	7.31	7.31	7.24	7.19
0.25	6.97	7.23	7.28	7.17	7.15	7.13	7.11
1	6.94	7.58	7.51	7.61	7.42	7.61	7.45
2	6.96	7.42	7.55	7.59	7.47	7.53	7.50
3	6.82	7.64	7.68	7.66	7.52	7.66	7.53
4	6.79	7.50	7.40	7.38	7.32	7.28	7.32
5	7.03	7.05	7.13	7.10	7.07	7.02	7.07
6	7.01	6.97	6.96	7.10	7.06	7.11	7.11
7	7.09	7.06	7.15	7.10	7.12	7.13	7.15
Rata-Rata	6.97	7.29	7.31	7.30	7.23	7.26	7.25

b. Suhu

SUHU							
Hari	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
0	29.6	28.65	28.6	28.5	28.85	28.8	29.15
0.17	29.4	29.5	29.45	29.5	29.6	29.65	29.6
0.25	29.7	29.75	29.65	29.45	29.6	29.75	29.9
1	29.45	28.85	28.65	28.7	28.8	28.85	29.2
2	29.3	29.6	29.25	29.25	29.1	29.05	29.05
3	29.2	29.4	29.75	29.15	29.3	29.2	29.3
4	29.1	29.1	28.8	28.75	28.75	28.8	29.05
5	29.4	29.45	29.25	29.4	29.25	29.3	29.4
6	29.7	29.6	29.6	29.55	29.6	29.45	29.45
7	29.65	29.55	29.3	29.3	29.35	29.25	29.35
Rata-Rata	29.5	29.3	29.2	29.2	29.2	29.2	29.3

c. Salinitas

SALINITAS							
Hari	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
0	29.3	28.25	27.75	28.6	27.7	28.05	27.45
0.17	29.25	27.95	28.25	28.2	27.65	27.95	27.25
0.25	29.75	28.35	28.25	28.35	27.8	28.1	27.3
1	29.9	29.2	29.7	28.85	28.15	29.05	27.9
2	29.5	29.7	29.3	29.1	28.7	29.1	28.25
3	29.8	29.6	28.85	29.4	28.65	28.55	28.1
4	29.95	29.1	28.7	29.3	28.2	29.25	27.8
5	29.8	28.35	28.95	28.55	27.95	28.55	27.75
6	29.7	29	29.45	30.15	28.85	28.9	27.75
7	29.55	29.1	28.45	28.4	28.2	27.75	27.3
Rata-Rata	29.7	28.9	28.8	28.9	28.2	28.5	27.7

d. Jumlah Sel Mikroalga

Jumlah Sel Mikroalga							
Hari ke	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
0	0	106	106	76	74	32	36
1	0	119	140	94	68	32	80
2	0	130	168	96	108	30	92
3	0	82	200	68	102	16	66
4	0	74	348	42	136	50	132
5	0	152	172	162	82	106	144
6	0	142	176	146	138	48	86
7	0	120	116	68	98	18	6

e. Log CFU Koloni Bakteri

LOG CFU KOLONI BAKTERI						
REAKTOR	HARI					
	Hari 0	Jam Ke 4	Jam Ke 6	Hari 1	Hari 4	Hari 7
Kontrol	3.3711	4.1833	4.1761	3.4771	4.1761	4.1761
K1A	2.1761	3.3118	4.4771	3.3324	3.7443	3.1903
K1B	3.7672	4.3522	4.3979	3.0000	3.2175	3.6990
K2A	4.7404	4.9294	6.1775	3.6990	3.6021	3.8062
K2B	3.7597	5.2028	5.7818	3.6990	3.8129	3.7324
K3A	4.8603	5.1903	6.1790	6.1761	6.1818	4.6532
K3B	3.2041	3.5051	4.6484	3.9777	4.2095	4.3324

## Lampiran B.3. Hasil Uji AAS dan Bom Kalorimetri

### a. Hasil Uji AAS Larutan Stok

**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
**RESEARCH AND CONSULTING INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**

**REPORT**  
Certificate of Analysis

No: 27004/7.1/19-0212  
Order: Perencanaan  
Sample Name: Gas, T. 175 Surabaya on Petrolite  
Sample Ref.: Sir. CO-02  
Date: 02-02  
Sample Brand: GIGAS jumbuh-petrolitegas  
Sample Quantity: 12 April 2012  
Sample Condition: 12 April 2012

Chemical Laboratory Test results:

No	Unit	Result
1	g/g, CO	0.0000
2	g/g, SO	0.0000
3	g/g, NO	0.0000

12 April 2012 + 12 April 2012

12 April 2012  
Laboratory Director  
Dr. M. Lutfi, S.T.

Laboratory Office: E. Borekang Street, PUS and 14  
Telp: 882111111, Bina RCU – BAK Irfan  
Surabaya

b. Hasil Uji AAS Penelitian Utama (Awal dan Duplo)

**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
**PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**

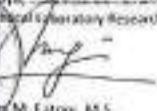
**REPORT**  
Certificate of Analysis

No : 071301/KI/IV-2018  
Code : Penelitian  
Sample Sealer : 0004.R. ITI Surabaya  
Sample Name : Air Cr  
Test : Cr  
Sample Brand :  
Sample Identity : Galton Nominon  
Sample Accepted : 27 April 2018

Chemical laboratory test results:

Kode	Cr, ppm
R 1	16,48
2	16,51
3	16,61
4	16,90
5	16,40
6	16,49
7	16,52
R 0	16,52

**AWAL HARI 0**

Surabaya, 20 April 2018  
Head of Chemical Laboratory Researcher  
  
M. Faton, M.S.

Laboratory Office II, Ketintang Baru XVb no 14  
Telp 08155151337, Bank BCA – Bank Jatim  
Surabaya

**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
**PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**



**REPORT**

Certificate of Analysis

No : 07119/XI/VI-2018  
 Code : Penelitian  
 Sample Seiver : Pils. PL (TS Surabaya)  
 Sample Name :  $Al_2O_3$   
 Test :  $Ca^{+2}$   
 Sample Grav :  
 Sample Identity : Di Lant. kalung lingsar  
 Sample Accepted : 1 Mei 2018

Chemical laboratory test result is :

KODE	$Ca^{+2}$
1	16,51
2	15,71
3	14,87
4	15,90
5	14,05
6	15,01
7	14,49

**AWAL HARI 7**



Laboratory Office Jl. Kertawang Baru XVI no 14  
 Telp 08155551117, Bank BCA – Bank 1500  
 Surabaya

**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
**PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**



**REPORT**

Certificate of Analysis

No : 07207/KI/II-2018  
Code : Penelitian  
Sample Sender : No. TL ITS Surabaya  
Sample Name : Air Dumi  
Test : Cr  
Sample Brand :  
Sample Identity : Cairan keuhak  
Sample Accepted : 30 Mei 2018

Chemical laboratory test result is:

Kode	Cr, ppm
0, R 1	10,92
2	10,88
3	10,90
4	10,88
5	10,82
6	10,92
7	10,93
7, R 1	10,12
2	14,15
3	13,05
4	13,20
5	14,12
6	15,08
7	13,30

**DUPLO**

5 Juni 2018  
Head of Laboratory Researcher  
  
M. Fikri, M.S.

Laboratory Office Jl. Ketintang Baru XVII no 14  
Telp: 08155151337, Bank BCA – Bank Jatim  
Surabaya

c. Hasil Uji Bom Kalorimetri

**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
**PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**

**REPORT**  
Certificate of Analysis

No. : 07241/R1/VI-2010  
Code : Dismililit  
Sample Sealer : Bim. El ITS Bersinya  
Sample Name : Alga-Dip Mago  
Test : Kalori  
Sample brand :  
Sample Identity : Driedan kacanglutan  
Sample Accepted : 7 Juli 2010

Chemical laboratory test result is:

<u>Nama</u>	<u>RHasil/ig</u>
A, Pilsen Alga	+ 4569,80
B, Dip Mago	+ 4420,10

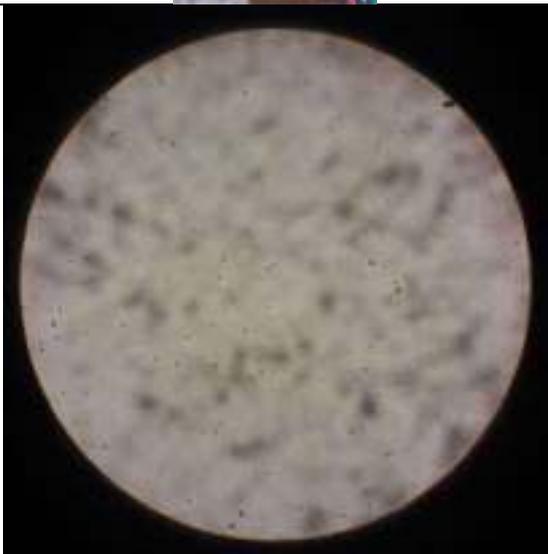
  
Surabaya, 25 Juli 2010  
M. Fauzi, M.S.  
Chemical Laboratory Researcher

Laboratory Office B. Kertitang Baru XVI no 14  
Telp: 08255151337, Bank BCA – Bank Jatim  
Surabaya

### LAMPIRAN C. DOKUMENTASI PENELITIAN

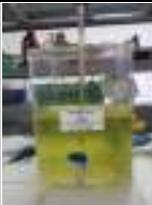
No	Dokumentasi	Keterangan
1		Proses pembuatan reaktor
2		Sentrifugasi pada uji Klorofil A
3		Penimbangan bubuk $K_2Cr_2O_7$ untuk pembuatan larutan stok limbah
4		Uji Range Finding Test pada Mikroalga
5		Pengukuran pH, Suhu, dan Salinitas

No	Dokumentasi	Keterangan
6		Aktifasi stok mikroalga yang sebelumnya diawetkan dalam lemari pendingin untuk digunakan kembali pada penelitian
7	 <p style="text-align: center;">a</p>  <p style="text-align: center;">b</p>	a. Proses panen mikroalga untuk dijadikan stok. Kegiatan dilakukan secara aseptik. b. Hasil panen (botol besar) dibanding dengan inokulum awal
8		Perubahan fisik pada uji RFT hari ke 0 (atas) dan hari ke 7 (bawah)

No	Dokumentasi	Keterangan
9		<p>Penghitungan jumlah sel mikroalga menggunakan mikroskop dan counter</p>
10		<p>Sel mikroalga yang terlihat pada mikroskop</p>
11		<p>Proses oven biomassa untuk uji bom kalorimeter</p>

No	Dokumentasi	Keterangan
12		<p>Sterilisasi reaktor dibawah sinar UV Laminar Air Flow</p>
13		<p>Hasil trial and error absorbansi sebesar 0,501 A untuk penentuan inokulum awal bakteri</p>
14		<p>Hasil uji MIC tambahan pada konsentrasi 20 mg/L</p>
15		<p>Hasil uji MIC tambahan pada konsentrasi 30 mg/L</p>

No	Dokumentasi	Keterangan
16		<p>Hasil uji MIC tambahan pada konsentrasi 40 mg/L</p>
17		<p>Proses inokulasi mikroalga dan penambahan nutrient ke reaktor propagasi</p>
18		<p>Kondisi proses propagasi mikroalga</p>
19		<p>Peralatan uji trial and error absorbansi</p>
20		<p>Kondisi reaktor utama pada penelitian utama</p>

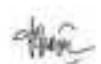
Hari ke	Penampakan Reaktor ke							
	1	2	3	4	5	6	7	
0								
7								
								

## LAMPIRAN D. DOKUMEN SIDANG UJIAN LISAN TUGAS AKHIR

### Lampiran D.1. Berita Acara Seminar Kemajuan Tugas Akhir

	PROGRAM SARJANA DEPARTEMEN TEKNIK LINGKUNGAN FAKULTAS TEKNIK SIPIL, LINGKUNGAN DAN KEBUMAHAN-ITS Kampus ITS Sukoharjo, Surabaya 60111. Telp: 031-846388. Fax: 031-846337	
WTA-01-PL-03	TUGAS AKHIR	Nomor SK : 06141381 (06/0)
Fakultas: Geomatika		Ts. Benda 01
<b>FORUM TUGAS AKHIR KTA-02</b> Forum Pengantar dan Saran Dosen Pembimbing Seminar Kemajuan Tugas Akhir		
Hari, tanggal	Rabu, 03-04-13	Nilai TOEFL 440
Pukul	10.00-11.00	
Lokasi	TL 102	
Judul	WIDIMARSI HERMAYENT (CHROMIUM (Cr <sup>6+</sup> )) PADA LIMBAH CAIR MENGUNAKAN KONDISIUM BAKTERI DARI LUMBAH DAUNGAN SISTEM MODIFIKASI HIGH RATE ALGAL	
Nama	MALIN BERLAWITO	Tanda Tangan
NIM	102114000008	
Tempat	RENELTIM LABORATORIUM	

No. Hal	Ringkasan dan Saran Dosen Pembimbing Seminar Kemajuan Tugas Akhir
1	<p>Final materi ini yg diujikan adalah hasil wawancara, city profile, dan data data Cr<sup>6+</sup> yg terdapat.</p> <p style="text-align: right;"> 07/04/2013</p>

Dosen Pembimbing akan melaksanakan format KTA-02 di Semester Program Gelar.  
 Jumlah di bahan mahasiswa 300000 saat ini ke arah Dosen Pembimbing.  
 Untuk itu diharapkan sebelum hari ini dapat sudah menyiapkan dokumen Pembimbing.

Setelah hasil evaluasi Dosen Pengantar dan Dosen Pembimbing, dinyatakan mahasiswa tersebut:

1. Dapat melanjutkan ke Tahap Ujian Tugas Akhir
2. Tidak dapat melanjutkan ke Tahap Ujian Tugas Akhir

Dosen Pembimbing  
**RESY VULANT TANGKUL, S.T.M, Ph.D**



## Lampiran D.2. Formulir Perbaikan Seminar Kemajuan



**ITS**  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

JURUSAN TEKNIK LINGKUNGAN  
FAKULTAS TEKNIK SIPIL DAN PERENCANAAN  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER

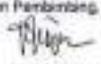
FORM FTA-04

### FORMULIR PERBAIKAN LAPORAN TUGAS AKHIR

Nama : Nelly Erlanto  
 NRP : 02091400069  
 Judul Tugas Akhir : Optimisasi Ciptaan Beda Lintang-Ger Mengedari Konstruksi Baku dan Materialnya Dengan Sistem High Rate Alkali Alkali

No	Saran Perbaikan (sesuai Form KTA-02)	Tanggapan / Perbaikan (bila perlu, sebutkan halaman)
1.	Berdasarkan Ketentuan Mahasiswa pada judul untuk perlu, apakah halaman esai.	1. Judul telah diganti dengan "irisan"
2.	Perubahan judul Beranda → Sistemisasi	2. Judul telah diubah dari "beranda" menjadi "Sistemisasi"
3.	Daftar isipran belum ditambahkan halaman	3. Seluruh daftar isipran telah diberi nomor halaman
4.	Judul ada typo (a)	4. Daftar isipran sudah dikoreksi typo (a)
5.	Esai/ foto tidak jelas	5. Foto telah diperbesar di halaman 77
6.	Saran belum ada	6. Sudah ditambahkan saran pada bab 5 di halaman 83

Dosen Pembimbing



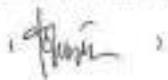
Nelly Erlanto Target, C.T, M.T, R.D

Mahasiswa



Nelly Erlanto

### Lampiran D.3. Berita Acara Sidang Ujian Lisan Tugas Akhir

 <p>PROGRAM BAKTERIA DEPARTEMEN TEKNIK LINGKUNGAN FTLK-ITS FAKULTAS TEKNIK SIPIL, LINGKUNGAN DAN KEBUMIHAN - ITS Kampus ITS Sukoharjo, Sekeloa 60111, Telp: 031-8484188, Fax: 031-8484287</p>		
UJIAN-TL-02	TUGAS AKHIR	Kode SKR : RE-14581 (SAR)
Periode: Ganjil 2017/2018		No. Revisi: 01
<p>FORMULIR TUGAS AKHIR UTA-02 Pembuat: Ningsuland dan Sarah Desca Pembimbing Ujian Tugas Akhir</p>		
Nomor tanggal	: Rata, 11 A.P. 2018	Nilai TOEFL : 460
Mulai	: 13.00 - 15.00 WIB	
Lokasi	: TL-102	
Judul	<p>DEKONSENTRASI CHROMIUM MENGGUNAKAN KONSORSIUM BAKTERI DAN MIKROALGA DENGAN SISTEM HIGH RATE ALGAL REACTOR</p>	
Nama	: MAJUK BERDARTO	Tanda Tangan
NRP.	: 5201140003063	
Tempat	: Perancis	
No. Hal.	<p>Berkas dan Surat Desca Pembimbing Ujian Tugas Akhir</p>	
	<p>pernyataan sesuai dengan surat pernyataan dan dosen pengaji</p> <p style="text-align: right;"> 12/07/2018</p>	
<p>Dosen Pembimbing akan menandatangani formulir UTA-02 ini sebagai Program Sarjana Formulir ini harus dibawa mahasiswa saat sidang di hadapan Dosen Pembimbing Formulir akan dipublikasikan melalui website sebagai catatan persiapan Dosen Pembimbing</p>		
<p>Berdasarkan hasil evaluasi Dosen Pengaji dan Dosen Pembimbing, dinyatakan mahasiswa tersebut:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lulus Ujian Tugas Akhir</li> <li>2. harus mengikuti Ujian Tugas Akhir semester berikutnya</li> <li>3. Tugas Akhir dinyatakan gagal atau harus mengganti Tugas Akhir (lebih dari 2 semester)</li> </ol>		
<p>Dosen Pembimbing BESY VOLJANT TANDAKU, ST., MT., PhD</p> <p style="text-align: right;"></p>		

## Lampiran D.4. Formulir Perbaikan Sidang Ujian Lisan Tugas Akhir



**ITS**  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

**DEPARTEMEN TEKNIK LINGKUNGAN  
FAKULTAS TEKNIK SIPIL LINGKUNGAN DAN KEBUMIHAN  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER**

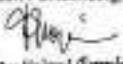
**FORM PTA-01**

**FORMULIR PERBAIKAN LAPORAN TUGAS AKHIR**

**Nama :** MALIK SEPULHITO  
**NRP :** 05301410000045  
**Judul Tugas Akhir :** ANALISIS KINEMATIKA DAN DYNAMIS MENGGUNAKAN KONSEP LEMBUAN SAKTIF DAN Mekanisme PERANG SISTEM HIGH RATE ALUMEL REAKTOR

No	Saran Perbaikan (sesuai Form UTA-02)	Tanggapan / Perbaikan (bila perlu, sebutkan halaman)
1.	Berilah satuan $C_{14}$ , $C_2$ total	Telah ditambahkan pada halaman 116 mengenai abstraksi persamaan tersebut
2.	Berilah satuan persamaan berat kering	Telah ditambahkan pada halaman 116 mengenai persamaan berat kering yg sudah SEM-SEM & Gasifikasi
3.	Mekanisme → susunan picture	Mekanisme penyajian telah diubah ke BAB 2 di Hal. 91-92.
4.	Penambahan bakteri yang juga pernah manusia?	telah ditambahkan di hal. 118
5.	Bakteri gasifier / mikroorganisme lain apa??	telah ditambahkan di hal. 98
6.	(C <sub>1</sub> ) nilai awal berapa?	telah ditambahkan di halaman 98
7.	bagi ke 5 nomor di atasnya;	telah diteliti di halaman 62
8.	6.4.3 perlu ditinjau pul hal 77	telah ditinjau dan ditambahkan di hal. 88
9.	Uji pertumbuhan & siklus dimasukkkan di BAB 2	telah diteliti di BAB 2 hal 46.

Dosen Pembimbing



**Dr. Eng. Volenti Darsono, C.T., M.T., Ph.D.**

Mahasiswa Ybs.



**MALIK SEPULHITO**





## BIOGRAFI PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Malik Berlianto. Dilahirkan di Sampang – Madura pada tanggal 18 April 1996 dan merupakan anak terakhir dari 4 bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan dasar pada tahun 2002-2008 di SDN Rongtengah 1 Sampang, kemudian dilanjutkan ke SMP Negeri 1 Sampang pada tahun 2008-2011, hingga pendidikan tingkat atas yang ditempuh di SMA Negeri 3 Pamekasan pada tahun 2011-2014. Pada tahun 2014, Penulis melanjutkan kuliah di Jurusan Teknik Lingkungan FTSLK, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya. Kecintaan penulis terhadap ilmu manajerial dan keilmiahan membuat penulis aktif di organisasi serta kegiatan keilmiahan selama perkuliahan. Penulis pernah aktif sebagai anggota Himpunan Mahasiswa Teknik Lingkungan (HMTL) 2015/2016 sebagai staff Bidang Aplikasi Teknologi, Departemen Riset dan Teknologi. Tahun selanjutnya menjadi Kepala Departemen Riset dan Teknologi HMTL 2016/2017 dan Kepala Divisi Humas Trainer Keilmiahan Integrator ITS 2017/2018. Penulis juga sering mengikuti berbagai jenis pelatihan manajerial dan keilmiahan serta berkesempatan menjadi asisten laboratorium praktikum Kimia Lingkungan 2, Mikrobiologi Lingkungan, dan Remediasi Badan Air dan Pesisir. Penulis juga pernah menjadi asisten dosen Wawasan Teknologi dan Komunikasi Ilmiah. Prestasi yang pernah ditorehkan penulis selama perkuliahan adalah Juara 1 LKTIN Superhero Lingkungan IV Universitas Jember 2016, Juara 1 LKTIN Kreativitas Mesin Brawijaya 2017, dan beberapa PKM terdantai. Penulis juga pernah melakukan kerja praktik di PT Pertamina EP Asset 1 Jambi Field, Jambi. Penulis dapat dihubungi via email [malik.berlianto96@gmail.com](mailto:malik.berlianto96@gmail.com).

