SKRIPSI

BIODEKOLORISASI METILEN BIRU OLEH KULTUR CAMPURAN BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* DAN JAMUR PELAPUK PUTIH *Phlebia brevispora*

SAFIRA WAZNAH FATIHAH
NRP. 01211440000014

Dosen Pembimbing
Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si., M.Si
Adi Setyo Purnomo, S.Si., M.Sc., Ph.D

DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018

SCRIPT

BIODECOLORIZATION OF METHYLENE BLUE USING *Pseudomonas aeruginosa* and *Phlebia brevispora* MIXED CULTURES

SAFIRA WAZNAH FATIHAH
NRP. 01211440000014

Supervisors
Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si., M.Si
Adi Setyo Purnomo, S.Si., M.Sc., Ph.D

DEPARTEMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOMPEMBER
SURABAYA
2018

BIODEKOLORISASI METILEN BIRU OLEH KULTUR CAMPURAN BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* DAN JAMUR PELAPUK PUTIH *Phlebia brevispora*

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Program Studi S-1 Departemen Kimia
Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

Oleh:

SAFIRA WAZNAH FATIHAH
NRP. 01211440000014

DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018

LEMBAR PENGESAHAN

BIODEKOLORISASI METILEN BIRU OLEH KULTUR CAMPURAN BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* DAN JAMUR PELAPUK PUTIH *Phlebia brevispora*

SKRIPSI

Oleh:

SAFIRA WAZNAH FATIHAH
NRP: 01211440000014

Surabaya, 28 Juni 2018
Menyetujui,

Dosen Pembimbing I	Dosen Pembimbing II
Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si., M.Si	**Adi Setyo Purnomo, MSc., Ph.D.**
NIP. 19810125 200812 1 001	**NIP. 19800724 200812 1 002**

Mengetahui,
Kepala Departemen Kimia,

Prof. Dr. Didik Prasetyoko, MSc.
NIP. 19710616 199703 1 002

BIODEKOLORISASI METILEN BIRU OLEH KULTUR CAMPURAN BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* DAN JAMUR PELAPUK PUTIH *Phlebia brevispora*

Nama : **Safira Waznah Fatihah**
NRP : **01211440000014**
Jurusan : **Kimia FIA – ITS**
Dosen Pembimbing : **Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si., M.Si**

ABSTRAK

Metilen Biru (MB) merupakan salah satu pewarna yang umum digunakan dalam industri. Penghilangan zat warna MB yang efektif dapat berlangsung secara biologis menggunakan aktivitas mikroorganisme. Pada penelitian ini metilen biru dihilangkan melalui proses biodekolorisasi oleh kultur campuran jamur pelapuk putih *Phlebia brevispora* dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Proses biodekolorasi MB dengan konsentrasi 100 mg/L diamati selama 7 hari di dalam media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) dengan variasi penambahan volume *P. aeruginosa* sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 10 mL terhadap 1 mL *P. brevispora*. Analisis dekolorisasi metilen biru diukur menggunakan instrumen UV-Vis dan metabolit produk yang dihasilkan organisme dianalisis menggunakan instrumen LC-MS/TOF. Kultur campuran mampu mendekolorisasi MB sebesar 39,28% sedangkan dekolorisasi menggunakan *P. brevispora* mencapai 1,58%. Metabolit yang dihasilkan dari proses dekolorisasi MB adalah $C_{16}H_{18}N_3O_5S$.

Kata kunci : Biodekolorisasi, Metilen Biru, Pseudomonas aeruginosa, Phlebia brevispora, Kultur Campuran

BIODECOLORIZATION OF METHYLENE BLUE USING *Pseudomonas aeruginosa* and *Phlebia brevispora* MIXED CULTURES

Name : **Safira Waznah Fatihah**
NRP : **01211440000014**
Department : **Kimia FIA – ITS**
Supervisor : **Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si., M.Si**

ABSTRACT

Dye is compound with high stability which caused by its complex aromatic structure. It makes dye to potentially become a water pollutant and causes negative effects on organism. In this study, MB was removed by biodecolorization process using white-rot fungus *Phlebia brevispora* and *Pseudomonas aeruginosa* mixed culture. *P. aeruginosa* with volume 2, 4, 6, 8, 10 mL and 100 mg / L MB were added in 1 mL *P. brevispora*. The biodecolorization was carried out in Potato Dextrose Broth (PDB) medium and was observed in 7 days. MB decolorization was measured using UV-Vis instrument and product metabolites produced by the organisms were analyzed using LC-MS / TOF instruments. *P. aeruginosa* and *P.brevispora* mixed culture able to decolorize MB up to 39,28%, meanwhile using *P. brevispora* pure culture is only up to 1,58%. Metabolites produced during decolorization MB by mixed cultures are $C_{16}H_{18}N_3O_5S$.

Key words : Biodecolorization, Methylene Blue, Pseudomonas aeruginosa, Phlebia brevispora, Mixed Cultures

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang selalu melimpahkan Rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan dengan baik naskah tugas akhir yang berjudul "**BIODEKOLORISASI METILEN BIRU OLEH KULTUR CAMPURAN BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* DAN JAMUR PELAPUK PUTIH *Phlebia brevispora***".

Tulisan ini tidak akan terwujud tanpa bantuan, dukungan, doa, serta dorongan semangat dari semua pihak. Sehingga penulis sangat berterima kasih kepada:

1. Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan selama proses penyusunan naskah Skripsi ini.
2. Adi Setyo Purnomo, S.Si, M.Sc, Ph.D selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan selama proses penyusunan naskah Skripsi ini.
3. Drs. Refdinal Nawfa, M.S selaku kepala laboratorium Kimia Mikroorganisme atas fasilitas yang diberikan.
4. Drs. R. Djarot S. K. S., MS. selaku dosen wali
5. Dra. Ratna Ediati, MS., Ph.D selaku Kepala Prodi Program Studi Kimia S1
6. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc**.** selaku Kepala Departemen Kimia atas fasilitas yang diberikan.
7. Kedua orang tua saya yang selalu memberikan dukungan dan doa

Penulisan naskah tugas akhir ini tidak lepas dari kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk dapat meningkatkan kualitas dan perbaikan.

Surabaya, 28 Juni 2018
Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN i
ABSTRAK ii
ABSTRACT iii
KATA PENGANTAR iv
DAFTAR GAMBAR viii
DAFTAR TABEL x
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 4
1.3 Batasan Masalah 4
1.4 Tujuan Penelitian 4
1.5 Manfaat Penelitian 4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 5
2.1 Bioremediasi 5
2.2 Biodegradasi 5
2.3 Pewarna Tekstil 6
2.4 Pewarna Thiazine 6
2.5 Metilen Biru 7
2.6 Penghilangan Warna (Dekolorisasi) 8
2.7 Jamur Pelapuk Putih 9
2.8 *Phlebia brevispora* 10
2.8 *Pseudomonas aeruginosa* 11

2.9 Biodekolorisasi Menggunakan Kultur Campuran Bakteri dan Jamur 12
2.10 Metode Analisis 15
2.10.1 Spektrofotometer UV-Vis 15
2.10.2 Turbidimetri 20
2.10.3 LC-TOF/MS 21
BAB III METODE PENELITIAN 25
3.1.1 Alat 25
3.1.2 Bahan 25
3.2 Prosedur Penelitian 25
3.2.1 Regenerasi bakteri *P. aeruginosa* 25
3.2.2 Regenerasi jamur *P. brevispora* 26
3.2.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *P. aeruginosa* 26
3.2.4 Persiapan Kultur Cair Jamur *P. brevispora* 26
3.2.5 Persiapan Kultur Cair Bakteri *P. aeruginosa* 26
3.2.6 Biodekolorisasi MB oleh Kultur Campuran Jamur *P. brevispora* dan Bakteri *P. aeruginosa* pada Media Cair 26
3.2.7 Analisis Biodegradasi MB dan Metabolit Produk 27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 29
4.1 Regenerasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 29
4.2 Regenerasi Jamur *Phlebia brevispora* 30
4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri *P. aeruginosa* 31
4.4 Biodekolorisasi Metilen Biru oleh Bakteri *P. aeruginosa* 33

4.5 Biodekolorisasi Metilen Biru oleh Kultur Campuran Bakteri *P. aeruginosa* dan Jamur *P. brevispora* 37
4.6 Analisis Produk Metabolit Hasil Biodekolorisasi MB Oleh Kultur Campuran *P. aeruginosa* dan *P. brevispora* Menggunakan LC-TOF/MS 44
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 49
5.1 Kesimpulan 49
5.2 Saran 49
DAFTAR PUSTAKA 51
Lampiran 1. Diagram Alir 65
Lampiran 2. Perhitungan 67
Lampiran 3. Data Analisis Sampel 68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur molekul senyawa thiazine 7
Gambar 2. 2 Struktur Senyawa MB 8
Gambar 2. 3 *Pseudomonas aeruginosa* Pada Media Agar 11
Gambar 2. 4 Jalur Degradasi Metilen Biru oleh Jamur *D. Dickinsii* 14
Gambar 2. 5 Susunan Komponen Spektrofotometri UV-Vis 16
Gambar 2. 6 Skema Alat TOF-MS 24
Gambar 4. 1 Hasil Regenerasi Bakteri *P. aeruginosa* Pada NA 29
Gambar 4. 2 Regenerasi Jamur *P. brevispora*: (A) kultur hari ke-0; (B) kultur hari ke-7 30
Gambar 4. 3 Kurva Pertumbuhan Bakteri *P. aeruginosa*. a. Fase lag, b. Fase log, c. Fase stasioner, d. Fase kematian (*decay*) 32
Gambar 4. 4 Dekolorisasi MB oleh *P. aeruginosa* pada PDB. (A) bakteri 10 mL, (B) bakteri 8mL, (C) bakteri 6 mL, (D) bakteri 4 mL, (E) bakteri 2 mL dan (F) Kontrol bakteri 33
Gambar 4. 5 Profil sampel dekolorisasi MB oleh *P. aeruginosa* dengan volume bakteri (A) 2 mL, (B) 4 mL, (C) 6 mL, (D) 8 mL, (E) 10 mL dan (F) kontrol abiotik .. 34
Gambar 4. 6 Profil Dekolorisasi MB oleh Bakteri *P.aeruginosa* 35
Gambar 4. 7 Trend Biodekolorisasi MB oleh *P.aeruginosa* 37
Gambar 4. 8 Dekolorisasi MB oleh kultur campuran pada PDB. (a) bakteri 2 mL, (b) bakteri 4 mL, (c) bakteri 6 mL, (d) bakteri 8 mL, (e) bakteri 10 mL, (f) kontrol biotik jamur *P. brevispora* 38
Gambar 4. 9 Profil Dekolorisasi oleh Kultur Campuran Bakteri *P. aeruginosa* dan jamur *P.brevispora* 39

Gambar 4. 10 Persentase Biodekolorisasi MB oleh Kontrol Bakteri (*P. aeruginosa*) dan Kultur Campuran (*P. aeruginosa* dan *P. brevispora*)..... 41
Gambar 4. 11 Persentase Biodekolorisasi MB oleh Kontrol Bakteri (*P. aeruginosa*), kontrol jamur (*P. brevispora*), Kultur Campuran (*P. aeruginosa* dan *P. brevispora*)..... 42
Gambar 4. 12 Interaksi antara *P. aeruginosa* dan *P. brevispora* 43
Gambar 4. 13 Kromatogam Hasil Dekolorisasi MB oleh Kultur Campuran Bakteri *P. aeruginosa* dan Jamur *P. brevispora* selama 7 hari. Kromatogram Kontrol (Merah), Kromatogram Perlakuan (Pink)..... 45
Gambar 4. 14 Spektra MS Senyawa Metilen Biru..... 46
Gambar 4. 15 Jalur Transformasi MB oleh Kultur Campuran (Zhi dkk., 2018) 47

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Data Kuantitatif Biodekolorisasi MB oleh *P. aeruginosa* 36
Tabel 4.2 Hasil Degradasi Metilen Biru oleh Kultur Campuran Bakteri *P. aeruginosa* dan Jamur *P. brevispora* 40
Tabel 4.3 Metabolit Hasil Dekolorisasi MB oleh Kultur Campuran 46

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pewarna buatan umum digunakan dalam industri tekstil, kertas, kulit, pulp, plastik dan industri percetakan. Pewarna adalah senyawa organik yang tersusun atas molekul aromatis yang kompleks (Mishra dan Tripathi, 1993 ; Saratale dkk., 2011), sehingga pewarna tidak mudah luntur terhadap cahaya, air, bahan kimia dan zat pengoksidasi (Khan dan Husain, 2007; Noraini dkk., 2012). Meskipun pewarna memiliki banyak kegunaan namun penggunaanya dapat menimbulkan masalah lingkungan. Zat warna dapat menjadi polutan di dalam perairan. Adanya pewarna dalam perairan akan menghalangi penetrasi sinar matahari ke dalam air dan akan mengganggu ekosistem air (Saratale dkk., 2011; Bae dan Freeman, 2007; Widjajanti dkk., 2011). Pada jumlah yang kecil pewarna beracun bagi organisme dalam air (Ghaedi dkk., 2014). Hal tersebut dikarenakan pewarna dapat menjadi sumber terbentuknya fenol dan senyawa fenolik lainnya (Houas dkk., 2001; Wanga dkk., 2016; Fan dkk., 2009; Chen dkk., 2008). Dibandingkan dengan pewarna dari kelas lain, pewarna kationik memiliki tingkat toksisitas yang tinggi (Ghaedi dkk., 2014). Metilen Biru (MB) merupakan salah satu pewarna yang digunakan dalam industri tekstil. MB digunakan sebagai pewarna kertas, cat rambut, wol, kain katun, dan *coating* pada kertas (San dkk., 2014). MB merupakan pewarna yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan pewarna thiazine (kationik) lain (Hamdaoui dan Chiha, 2006). Penanganan terhadap zat warna MB perlu dilakukan karena MB dapat berpotensi sebagai polutan dan dapat mencemari lingkungan.

Salah satu cara penanganan yang dinilai cukup efektif, relatif lebih murah, dan ramah lingkungan adalah bioremediasi (San dkk., 2014). Jamur dan bakteri merupakan mikroorganisme yang sering digunakan dalam metode bioremediasi. Jenis jamur yang banyak dimanfaatkan dalam bioremediasi adalah jamur pelapuk putih. Jamur pelapuk putih memiliki kemampuan untuk mendegradasi lignin maupun senyawa mirip lignin (Jayasinghe dkk., 2008). Lignin dapat didegradasi karena jamur pelapuk putih menghasilkan enzim ligninolitik seperti lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP), dan lakase (Boominathan dan Reddy, 1992; Buswell dkk., 1987; Hatakka, 1994; Kirk dan Farrell, 1987), sehingga jamur pelapuk putih mampu mendegradasi polutan-polutan organik, salah satunya adalah pewarna sintesis (Fu dan Viraraghavan, 2001; Singh, 2006; Reddy dan Matthew, 2001). Pada penelitian sebelumnya sebagian besar jamur pelapuk putih yang digunakan adalah *P. chrysosporium* (Heinfling dkk., 1997; Knapp dkk., 1995; Novotny dkk., 2001), *Bjerkandera* sp. (Moreira dkk., 2000), *B. adusta* (Heinfling dkk., 1997), *Trametes versicolor* (Knapp dkk., 1995; Novotny dkk., 2001), dan *Pleurotus ostreatus* (Knapp dkk., 1995; Novotny dkk., 2001).

Selain jamur, bakteri juga merupakan mikroorganisme yang digunakan dalam bioremediasi. Kelebihan dari penggunaan bakteri untuk menghilangkan pewarna adalah bakteri mampu tumbuh dan mendegradasi pewarna lebih cepat dibandingkan dengan jamur (Malik, 2004). Penelitian sebelumnya banyak menggunakan bakteri yang berasal dari genus *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Desulphovibrio*, *Proteus*, *Schewanella* and *Alcaligenes* (An dkk., 2002; Nigam dkk., 1996; Saratale dkk., 2011; Sharma dkk., 2004; Tony dkk., 2009; Wang dkk., 2012).

Kelebihan dalam penggunaan kultur campuran untuk menghilangkan pewarna adalah jamur dan bakteri dapat menyerang molekul pewarna dari berbagai arah dan dapat menggunakan produk intermediet untuk proses mineralisasi lebih lanjut (Qu dkk., 2010). Penambahan bakteri pada *T.versicolor* dan *P.ostreatus* dapat meningkatkan biodegradasi. Hal ini disebabkan bakteri dapat meningkatkan aktivitas enzim lakase pada jamur ligninolitik (Baldrian, 2004; Hiscox dkk., 2010). Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kultur campuran dapat mendegradasi pewarna azo (Lade dkk., 2016; Su dan Lin, 2013).

Phlebia brevispora termasuk jamur pelapuk putih yang dapat digunakan dalam bioremediasi. *P. brevispora* TMIC33929 dapat mendegradasi dioxin antara lain 1,3,6,8- TCDD dan monohidroksi-TCDD, monometoksi-TCDD, dimetoksi-TCDD, dimetoksi-triCDD (Kamei dkk., 2006). *P. brevispora* mampu mendegradasi pewarna antraquinon Remazol brilliant blue R (RBBR) (Lee dkk., 2017). Di lain pihak, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram-negatif dan diaplikasikan untuk bioremediasi antara lain untuk dekolorisasi pewarna MB (San dkk., 2014) dan bioremediasi tanah yang terkontaminasi minyak bumi (Karamalidis dkk., 2010) Penelitian tersebut menunjukkan bahwa bakteri *P. aeruginosa* dan jamur *P. brevispora* dapat diaplikasikan untuk menangani polutan organik dan pewarna. Informasi tersebut menjadi dasar dalam pengujian kemampuan dekolorisasi dari kultur campuran bakteri *P. aeruginosa* dan jamur *P. brevispora* terhadap pewarna sintetik MB.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang diangkat pada penelitian ini adalah proses menghilangkan pewarna MB melalui biodekolorisasi. MB merupakan pewarna yang berpotensi sebagai polutan dan dapat mencemari perairan. Pada penelitian ini dilakukan proses dekolorisasi secara biologis dengan menggunakan kultur campuran bakteri *P. aeruginosa* dan jamur pelapuk putih *P. brevispora*. Biodekolorisasi MB menggunakan kultur campuran jamur *P. brevispora* dan bakteri *P. aeruginosa* belum pernah dilakukan sebelumnya, sehingga perlu dilakukan penelitian.

1.3 Batasan Masalah

Proses biodekolorisasi oleh kultur campuran *P. aeruginosa* dan *P.brevispora* dilakukan pada MB dengan konsentrasi 100 mg/L. Kultur campuran terdiri dari 1 mL *P. brevispora* dan *P. aeruginosa* dengan variasi volume sebesar 2, 4, 6, 8, dan 10 mL (1 mL = 5,05 x 10^{12} CFU). Dekolorisasi dilakukan dengan waktu inkubasi 7 hari dan pada suhu 30°C pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kemampuan biodekolorisasi MB oleh kultur campuran bakteri *P. aeruginosa* dan jamur *P. brevispora* dan mengidentifikasi produk metabolit yang dihasilkan.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini untuk memberikan referensi alternatif dalam proses penghilangan pewarna khususnya MB dan memberikan data ilmiah mengenai kemampuan kultur campuran bakteri *P. aeruginosa* dan jamur *P. brevispora* dalam mendekolorisasi MB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bioremediasi

Bioremediasi merupakan pengembangan dari bioteknologi (Gadd, 2001). Bioremediasi adalah proses degradasi polutan di alam menjadi senyawa yang aman atau tidak terlalu beracun dengan menggunakan organisme maupun mikroorganisme. Proses degradasi menggunakan bakteri, jamur dan tumbuhan. Selain untuk menangani polutan organik, bioremediasi juga dapat diaplikasikan pada zat lain seperti limbah padat dan cair, bahan alam, dan polutan anorganik seperti logam beracun dan metaloid (Gadd, 2001). Terdapat tiga tahapan dalam proses bioremediasi yaitu *natural attenuation*, biostimulasi, dan bioaugmentasi. *Natural attenuation* adalah bioremediasi kontaminan menggunakan organisme asli/asal. Kedua adalah biostimulasi, yaitu penambahan oksigen dan nutrisi pada sistem untuk meningkatkan aktivitas biodegradasi. Bioaugmentasi adalah penambahan mikroorganisme ke dalam kontaminan dengan tujuan meningkatkan efisiensi biodegradasi (Diez, 2010).

2.2 Biodegradasi

Biodegradasi merupakan proses pemecahan senyawa organik menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan mikroorganise (Marinescu dkk., 2009). Umumnya produk yang dihasilkan dari proses biodegradasi adalah karbon dioksida. Mikroorganisme yang digunakan dalam biodegradasi adalah bakteri, jamur, ragi (Pramila dkk., 2012). Biodegradasi pewarna terjadi apabila terdapat perubahan struktur kimiawi pada gugus kromofor, auksokrom, maupun kedua gugus tersebut (Glenn dan Gold, 1983).

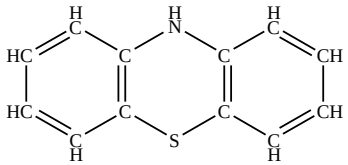
2.3 Pewarna Tekstil

Pewarna tekstil merupakan senyawa organik dengan struktur dasar berupa benzena (Mishra and Tripathi, 1993). Pewarna tersusun atas gugus kromofor dan auksokrom. Gugus kromofor akan menghasilkan warna sedangkan auksokrom berperan sebagai subtituen penarik ataupun pendonor elektron yang akan meningkatkan intensitas warna dari gugus kromofor (Christie, 2001). Contoh gugus kromofor antara lain: azo (N=N), metana (-CH=), karbonil (-C=O), dan gugus quinoid (NO_2). Contoh gugus auksokrom antara lain: amina ($-NH_3$), karboksil (-COOH), hidroksil (-OH), dan sulfonat (-SO-H) (Welham, 2000). Berdasarkan gugus kromofornya pewarna dikelompokkan menjadi: pewarna azo, antrakuinon, heterosiklik, thiazine, trifenil metan, dan lain-lain. Berdasarkan pengaplikasiannya pada substrat terdapat pewarna *reactive*, pewarna *direct*, pewarna *vat*, pewarna sulfur, pewarna *disperse*, pewarna *solvent*, pewarna basa, dan pewarna asam (Gadd, 2001). Pewarna merupakan senyawa yang stabil dan sulit untuk didegradasi (Seshadri dkk., 1994).

2.4 Pewarna Thiazine

Thiazine banyak dimanfaatkan sebagai pewarna, antioksidan, dan untuk *staining* pada mikroskop (Vara dan Ortiz, 2016). Pewarna ini memiliki kromofor utama berupa gugus thiazine. Thiazine analog dengan Oxazine dengan satu atom sulfur menggantikan atom oksigen di dalam cincin heterosiklik (Nietzki, 1888). Atom sulfur pada struktur thiazine menghubungkan dua cincin benzena dengan posisi orto terhadap gugus imido dan posisi para terhadap atom nitrogen.

Senyawa thiazine dapat terbentuk melalui reaksi antara thiodiphenilamin dengan gugus amido dan oksidasi yang menghasilkan gugus leuco. Hidrogen tersulfurisasi dalam larutan asam dapat menyebabkan paradiamin teroksidasi, sehingga satu atom nitrogen terlepas sebagai amonia dan dua molekul diamin bergabung. Kemudian atom sulfur masuk diantara dua molekul diamin yang tergabung sehingga menghasilkan senyawa thiazine (Nietzki, 1888). Struktur umum thiazine dapat dilihat pada Gambar 2.1.



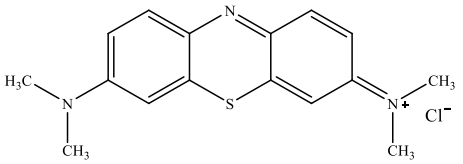
Gambar 2. 1 Struktur molekul senyawa thiazine (Nietzki, 1888)

Beberapa pewarna thiazine yang banyak digunakan antara lain metilen biru, thionol, thonoline, oksithiodiphenilamide (Nietzki, 1888).

2.5 Metilen Biru

Metilen biru (MB) merupakan senyawa aromatis heterosiklik yang memiliki rumus molekul ($C_{16}H_{18}ClN_3S.\ 3H_2O$) dengan nama kimia [3, 7-bis (dimetilamino)-phenazationium chloride tetramethylthionine chloride] (Wiklund dkk., 2007; Faber dkk., 2005). Berdasarkan gugus kromofornya MB termasuk dalam pewarna *thiazine*. Pada konsentrasi rendah, MB dapat menghasilkan warna yang pekat dibandingkan zat warna lain (Maurya dkk., 2006). MB dikelompokkan sebagai pewarna kationik dan bersifat basa (San dkk.,2014). MB merupakan salah satu zat warna yang banyak digunakan dalam industri tekstil

(Cragan, 1999). Panjang gelombang maksimum yang diserap oleh MB adalah 664 nm (Tarawou dan Horsfall, 2007). MB merupakan senyawa yang cukup stabil sehingga sulit terdegradasi di alam (Riyanto dan Tatang, 2009). Efek negatif terhadap manusia yang dapat ditimbulkan MB antara lain iritasi pada mata, kulit, dan saluran pencernaan serta sianosis (Hamdaoui dan Chiba, 2006). Struktur MB seperti pada Gambar 2.2.



Gambar 2. 2 Struktur Senyawa MB (Miclescu dan Wiklund, 2010)

2.6 Penghilangan Warna (Dekolorisasi)

Dekolorisasi dapat diartikan sebagai proses penghilangan warna (Koneman, 1994). Proses dekolorisasi dapat menjadi penanda awal terjadinya degradasi pewarna karena perubahan struktur kimia dapat meyebabkan penurunan intensitas warna (Martani dkk., 2003). Warna dapat dinyatakan dengan satuan absorbansi. Dekolorisasi menyebabkan penurunan intensitas absorbansi. Penurunan intensitas warna secara terus menerus menandakan dekolorisasi yang terjadi akibat biodegradasi, sedangkan dekolorisasi akibat biosorpsi ditandai dengan penurunan intensitas warna namun suatu saat akan konstan (Gadd, 2001).

Proses dekolorisasi oleh jamur dipengaruhi oleh beberapa kondisi. Kondisi yang mempengaruhi antara lain : buffer dan pH, nutrisi, dan temperatur. Sebagian besar jamur akan tumbuh

optimal pada suasana asam. Pada pH 4-5,5 proses dekolorisasi akan berjalan secara optimal. Pada pH >7 proses dekolorisasi tidak berjalan dan hanya akan terjadi jika pH diturunkan hingga mencapai pH optimalnya. Penelitian oleh Ollikka dkk. (1993) menemukan bahwa pH optimal dekolorisasi beragam bergantung pada zat pewarna yang dihilangkan dan bervariasi antara isoenzim. Pada pH 4-5,5 sebagian besar enzim pendegradasi bekerja optimal (Gadd, 2001). pH optimal untuk proses dekolorisasi oleh bakteri adalah antara 6-10 (Kodam dkk., 2005). Nutrien juga mempengaruhi proses dekolorisasi. Jamur membutuhkan sumber karbon, nitrogen, dan vitamin/mineral untuk tumbuh dan mendegradasi. Sumber karbon berfungsi untuk menstimulasi pertumbuhan dan memberikan suplai oksidan sebagai sumber energi jamur untuk proses dekolorisasi. Nitrogen dalam nutrien berfungsi untuk mendorong pembentukan enzim pendegradasi pada jamur. Jamur membutuhkan vitamin dan mineral untuk menstimulasi kemampuan jamur untuk mendegradasi. Sebagian besar jamur dapat tumbuh optimal pada suhu 27-30°C. Suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi enzim pendegradasi dan mengganggu kerja enzim (Gadd, 2001).

2.7 Jamur Pelapuk Putih

Jamur pelapuk putih menguraikan berbagai polutan karena dapat mendegradasi lignin. Lignin merupakan polimer utama yang terdapat pada tanaman berkayu. Struktur lignin tersusun secara tiga dimensi dan sangat kompleks (Gadd, 2001). Tiga enzim utama yang mampu mendegradasi lignin adalah Lakase, Lignin Peroksidase, dan Mangan Peroksidase. Pengaplikasian jamur pelapuk putih untuk proses degradasi pewarna dikarenakan kemampuan organisme tersebut untuk mendegradasi lignin (Shah

dan Nerud, 2002). Jamur pelapuk putih memiliki enzim yang tidak spesifik sehingga selain untuk memecah lignin juga dapat diaplikasikan pada senyawa aromatis terhalogenasi dan tidak terhalogenasi serta pada organopolutan yang tidak berupa aromatis (Gadd, 2001). Enzim pemecah lignin memiliki spesifitas substrat yang rendah sehingga memungkinkan untuk diaplikasikan pada limbah pewarna tekstil (Swamy dan Ramsay, 1999).

Jamur pelapuk putih dapat mendegradasi atau mengadsorbsi pewarna (Singh, 2006). Beberapa jamur mendekolorisasi pewarna hanya melalui proses adsorbsi, namun proses degradasi dan adsorbsi pada jamur pelapuk putih dapat terjadi secara serentak maupun bertahap (berurutan) (Knapp dkk., 2001). Adsorbsi terjadi terlebih dahulu kemudian diikuti oleh proses degradasi. Proses adsorbsi oleh miselium jamur berfungsi untuk mendekatkan gugus kromofor dengan enzim pendegradasi (Wang dan Yu, 1998).

2.8 *Phlebia brevispora*

Phlebia brevispora merupakan jamur pelapuk putih dan merupakan bagian dari *Basidiomycota* (Justo dkk., 2017). Jamur yang masuk dalam genus *Phlebia* sesuai untuk penelitian bioremediasi karena toleran terhadap kontaminasi lingkungan dapat menghasilkan enzim ekstraseluler untuk menguraikan lignin dengan spesifitas substrat yang rendah (Kuuskeri, 2016). Salah satu jenis jamur yang sering diaplikasikan dalam proses dekolorisasi berasal dari genus *Phlebia* (Solís dkk., 2012). *P. brevispora* dapat mendekolorisasi *Coracyl Brilliant Blue* sebanyak 64% dalam 48 jam dan 83% dalam 120 jam (Chander dan Kaur, 2015). Jamur *P. brevispora* memiliki taksonomi sebagai berikut :

Kerajaan : Fungi
Filum : Basiodiomycota
Kelas : Agaricomycetes
Bangsa : Cortociales
Keluarga : Corticiaceae
Marga : Phlebia
Jenis : *Phlebia brevispora*
(Encyclopedia of Life, 2018)

2.8 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram-negatif yang umumnya ditemukan di air, tanah,tanaman, dan manusia (Wu dkk., 2015). Ciri-ciri *P. aeruginosa* adalah berbentuk panjang (rod), tidak berspora, dan memiliki flagelum (Wu dkk., 2015). Bakteri ini tumbuh dengan baik pada suhu 25-37°C dan masih dapat bertahan hidup hingga suhu 42°C (Nazina dkk., 2005). Gambar 2.3 adalah bakteri *P. aeruginosa* yang tumbuh pada media agar.

Gambar 2. 3 *Pseudomonas aeruginosa* Pada Media Agar (Todar, 2004)

P. aeruginosa mampu bertahan hidup di lingkungan yang mengandung garam dan pewarna dengan konsentrasi tinggi. Metabolisme *P. aeruginosa* membutuhkan oksigen, namun bakteri ini dapat tumbuh tanpa oksigen selama masih terdapat gugus nitrat (Robertson dkk., 1989). Taksonomi bakteri *P. aeruginosa* adalah sebagai berikut :

Kerajaan : Bacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gamma proteobacteria
Bangsa : Pseudomonales
Keluarga : Pseudomadaceae
Marga : Pseudomonas
Jenis : *P. aeruginosa*
(Migula, 1900)

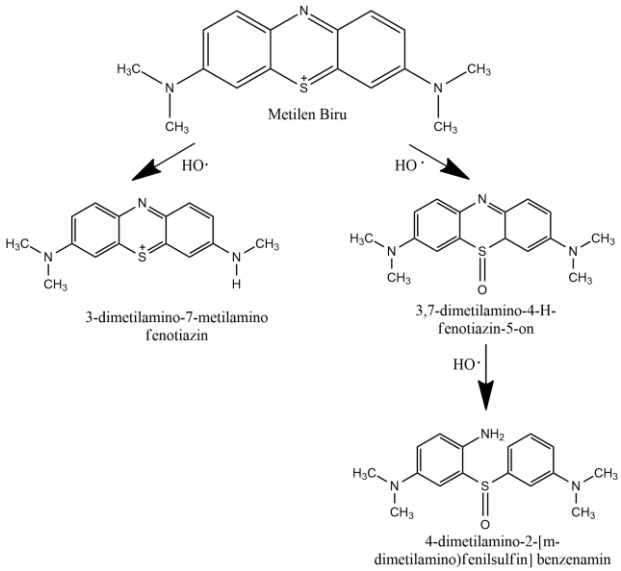
Strain *Pseudomonas* memiliki kemampuan dekolorisasi yang tinggi pewarna azo Acid Violet 7 dengan persentase dekolorisasi mencapai 97,4% (Yu dkk., 2001). Penelitian oleh Sarioglu, dkk. (2017) menyatakan bahwa bakteri *P. aeruginosa* yang dienkapsulasi jaringan *nanofibrous* mampu mendegradasi MB hingga 80%.

2.9 Biodekolorisasi Menggunakan Kultur Campuran Bakteri dan Jamur

Mikroorganisme dapat menghilangkan pewarna melalui dua cara yaitu : bioakumulasi dan biodegradasi. Pada bioakumulasi, pewarna akan teradsorp pada dinding sel mikroorganisme dan sangat bergantung pada biomassa, sedangkan biodegradasi adalah proses oksidasi pewarna oleh enzim. Bakteri dapat mendegradasi pewarna dalam kondisi aerob maupun anaerob (Kuhad dkk.,

2004). Bakteri digunakan untuk menghilangkan pewarna karena jumlah, aktivitas, kompatibilitas dan siklus pertumbuhannya lebih singkat (Pearce dkk., 2003). Proses dekolorisasi atau degradasi zat pewarna oleh bakteri lebih cepat dibandingkan jamur (Karapinar dkk., 2000; Pourbabaee dkk., 2006). Jamur dapat menghilangkan pewarna melalui mekanisme biosorpsi, biodegradasi, dan bioakumulasi. Biosorpsi dapat terjadi pada sel hidup maupun biomassa sel yang telah mati. Pada proses biosorpsi zat terlarut akan terikat pada biomassa (Tobin dkk., 1994). Proses biodegradasi melibatkan enzim untuk memecah pewarna menjadi berbagai produk, proses ini membutuhkan energi. Bioakumulasi terjadi apabila sel yang tumbuh mengakumulasi polutan (Aksu dan Donmez, 2005). Kekurangan dalam pengaplikasian jamur pada limbah pewarna adalah siklus pertumbuhan yang lama (Saratale dkk., 2011).

Pada penelitian oleh Rizqi dan Purnomo (2017) jamur *D. dickinsii* mampu mendegradasi MB hingga 53,55 % pada media cair PDB dengan waktu inkubasi selama 14 hari. Proses degradasi MB oleh jamur *D. dickinsii* berlangsung melalui reaksi Fenton, dimana hidroksi radikal bebas akan memutus ikatan kromofor pada MB. Jalur degradasi MB oleh *D. dickinsii* terjadi melalui dua sjalur. Pada jalur yang pertama MB mengalami oksidasi menjadi 3,7-bis (dimethylamino)-4αH-phenothiazin-5-one kemudian terdegradasi menjadi 4-(dimethylamino)-2-[m-(dimethylamino) phenylsulfiny] benzenamine. Pada jalur yang kedua MB terdegradasi menjadi 3-(dimethylamino)-7-(methylamino) phenothiazine (Rizqi dan Purnomo, 2017). Gambar 2.4 merupakan jalur degradasi MB oleh *D. dickinsii*.



Gambar 2. 4 Jalur Degradasi Metilen Biru oleh Jamur *D. Dickinsii* (Rizqi dan Purnomo, 2017)

Kelebihan degradasi pewarna menggunakan kultur campuran yaitu molekul pewarna dapat diserang oleh strain yang berbeda-beda dari berbagai arah, selain itu dapat terjadi proses mineralisasi lebih lanjut untuk menghasilkan senyawa yang tidak beracun dari produk metabolit intermediet telah dihasikan sebelumnya (Forgacs dkk., 2004; Keck dkk., 2002). Dalam penelitian Lade dkk. (2016) kultur campuran bakteri *Pseudomonas* sp. SUK1 dan *Aspergillus orchaceus* NCIM 1146 dapat meningkatkan proses degradasi dan detoksifikasi limbah tekstil dibandingkan kultur murni.

2.10 Metode Analisis

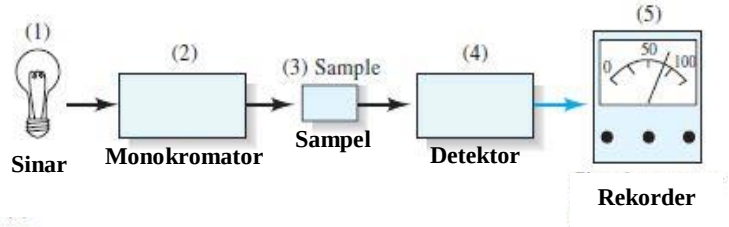
2.10.1 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah instrumentasi yang berfungsi untuk mengukur serapan dari hasil interaksi kimia antara molekul atau atom dari suatu zat kimia dengan radiasi elektromagnetik pada daerah sinar ultraviolet (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm). Panjang gelombang yang tersedia untuk pengukuran dimulai dari panjang gelombang pendek ultraviolet hingga ke garis inframerah (Skoog, 1998).

Prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis adalah mengukur jumlah cahaya yang diserap atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan, sebagian energi cahaya tersebut akan diserap (diabsorpsi). Kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu dinyatakan dalam satuan absorbansi (A). Nilai absorbansi setara dengan nilai konsentrasi larutan tersebut dan panjang berkas cahaya yang dilalui pada suatu titik dimana presentase jumlah cahaya yang ditransmisikan atau diabsorbsi diukur dengan phototube (Harmita, 2006). Hasil plot absorbansi dengan panjang gelombang akan menghasilkan spektrum absorpsi yang kontinu dan lebar dengan struktur berupa garis kecil (McMahon, 2008). Spektrofotometri UV-Vis dapat memberikan informasi mengenai panjang gelombang maksimum (λ maks). Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang saat eksitasi elektronik memberikan absorbansi terbesar. Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Analisis kualitatif dapat dilakukan melalui spektrofotometri UV-Vis karena terdapat molekul yang menghasilkan panjang gelombang maksimum yang pasti atau

tetap sehingga dapat digunakan sebagai data sekunder. Spektrofotometri UV-Vis untuk analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dan konsentrasi analit di dalam larutan dapat ditentukan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007).

Komponen dalam spektroskopi UV-Vis yaitu: (1) Sumber sinar; (2) Monokromator; (3) Wadah sampel; (4) Detektor; (5) Amplifier; (6) Recorder (Skoog, 2013; Mulja dan Suharman, 1995). Komponen di dalam spektrofotometer UV-Vis tersusun seperti pada Gambar 2.5.



Gambar 2. 5 Susunan Komponen Spektrofotometri UV-Vis (Skoog, dkk., 2013)

a. Sumber Cahaya
   Sumber sinar radiasi UV berasal dari lampu deuterium dengan jangkauan panjang gelombang 200-400 nm, sedangkan sumber radiasi pada pengukuran daerah sinar tampak dan NIR berasal dari lampu tungstein dengan rentang panjang 400-2500 nm (McMahon, 2008)
b. Monokromator
   Monokromator adalah alat yang berfungsi untuk memecah cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis (Harmita, 2006). Monokromator

digunakan untuk menyeleksi panjang gelombang. Komponen monokromator terdiri dari media untuk memecah cahaya polikromatis, celah (*slit*), dan lensa untuk memfokuskan radiasi yang dipilih. Medium untuk memecah cahaya polikromator berupa kisi difraksi seperti prisma atau filter optik (McMahon, 2008). Kisi akan memisahkan radiasi elektromagnetik sebaik mungkin sehingga didapatkan resolusi yang tinggi (Mulja dan Suharman, 1995; McMahon, 2008).

c. Wadah Sampel

Kuvet adalah wadah sampel yang akan dianalisis. Kuvet pada pengukuran menggunakan UV-Vis umumnya memiliki tebal sebesar 1 cm. Kuvet silika digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif pada pengukuran di panjang gelombang 190-1100 nm, sedangkan kuvet dari bahan gelas untuk pengukuran pada panjang gelombang 380-1100 nm karena bahan dari gelas menyerap radiasi UV (McMahon, 2008; Mulja dan Suharman, 1995).

d. Detektor

Detektor berfungsi untuk mengubah sinyal radiasi yang diterima menjadi sinyal elektronik (Mulja dan Suharman, 1995). Detektor biasanya berupa *photomultiplier tube* (PMT), *photodiode array* (PDA) atau *charge-coupled device* (CCD) (McMahon, 2008).

e. Amplifier

Amplifier berperan sebagai penguat sinyal listrik (Mulja dan Suharman, 1995). Amplifier akan mengubah sinar yang berasal dari detektor menjadi sinyal listrik (Khopkar, 2003).

f. Rekorder

Recoder bekerja sebagai alat pencatat, hasil dari recorder berupa gambar atau angka-angka (Harmita, 2006).

Hukum dasar dalam spektrofotometri menyatakan hubungan antara penurunan intensitas cahaya akibat serapan oleh larutan dengan konsentrasi dan panjang larutan tersebut (Gorog, 2018). Ketika larutan sampel dikenai radiasi UV-Vis maka akan ada sinar yang diteruskan dan sebagian lainnya akan diserap oleh sampel dengan intensitas tertentu. Sinar yang diserap oleh sampel dapat diketahui dengan membandingkan intensitas sinar yang diteruskan (I) dengan dengan intensitas sinar mula-mula (I_o). Serapan dapat terjadi apabila energi radiasi yang mengenai sampel sama dengan energi yang menyebabkan eksitasi elektron dari keadaan dasar menuju keadaaan tereksitasi. Penurunan intensitas sinar (dl) akibat melewati lapisan larutan dengan ketebalan db berbanding lurus dengan intensitas radiasi (I), konsentrasi spesies yang menyerap (c), dan ketebalan lapisan larutan (db) (Gandjar dan Rohman, 2018).

Hukum Lambert menyatakan bahwa logaritma rasio intensitas sinar yang masuk dan keluar dari sampel berbanding lurus dengan ketebalan sel yang disinari.

$$\log \frac{I}{I0} = \mathrm{k.b}$$

Hubungan antara serapan cahaya dengan konsentrasi dinyatakan dalam hukum Beer.

$$\log \frac{I}{I0} = \mathrm{k.c}$$

Apabila larutan berada dalam ketebalan sel yang konstan maka konsentrasi larutan berbanding lurus dengan logaritma rasio

intensitas sinar yang masuk dan keluar. Berdasarkan hukum Lambert dan Beer rasio intensitas sinar masuk dan keluar proporsional dengan konsentrasi maupun dengan ketebalan sel yang disinari. Kedua persamaan tersebut dapat digabungkan menjadi satu persamaan.

Persamaan untuk hukum Lambert-Beer adalah :

$$\mathrm{A} = \log \frac{I}{I0} = \mathrm{k.\,b.\,c}$$

Pada Hukum Lambert-Beer nilai tetapan (k) tergantung pada sistem konsentrasi yang digunakan. Tetapan disebut absortivitas (a) apabila konsentrasi dinyatakan dalam gram/L. Tetapan disebut absortivitas molar (ε) jika konsentrasi dinyatakan dalam mol/L

Rumus untuk Hukum Lambert-Beer adalah :

$$\mathrm{A} = \mathrm{a} \,.\, \mathrm{b} \,.\, \mathrm{c}\ (\mathrm{g/L}) \text{ atau } \mathrm{A} = \varepsilon \,.\, \mathrm{b} \,.\, \mathrm{c}\ (\mathrm{mol/L}) \qquad (2.1)$$

Dimana : A= Serapan (absorbansi)
ε = Absortivitas molar
a = Absortivitas
b = Ketebalan sel
c = Konsentrasi

Absortivitas merupakan konstanta yang dipengaruhi oleh suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang gelombang (Gorog, 2018; Rohman, 2007).

Rumus yang menyatakan hubungan antara absorbansi dan transmitan dinyatakan dengan :

$$T = \frac{I}{I0} \quad (2.2)$$

$$A = -\log T \quad (2.3)$$

Dimana : A = Absorbansi
I_0 = Intesitas awal
I = Intesitas akhir
T = Transmitan

(Burtis dkk., 2012)

Transmitan berfungsi untuk menandakan larutan yang tidak berwarna pada daerah *visible* (Gorog, 2018).

2.10.2 Turbidimetri

Turbiditas menunjukkan jumlah radiasi elektromagnetik yang tidak terserap melainkan dihamburkan (Lundblad dan Macdonald, 2010). Turbiditas adalah ukuran penurunan intensitas sinar datang per satuan panjang suspensi. Sinar yang dipantulkan merupakan fungsi konsentrasi. Jika turbiditas rendah maka akan semakin sedikit cahaya yang terhambur dari posisi awal.

Turbidimetri digunakan untuk analisis kuantitatif dengan mengukur kekeruhan dari suatu larutan yang disebabkan adanya suspensi partikel padat dalam larutan (Khopkar, 1990). Turbidimetri diaplikasikan untuk mengukur konsentrasi dispersi koloid dari senyawa organik maupun anorganik dan suspensi sel bakteri (Kar, 2005). Pengukuran sinar yang diteruskan oleh larutan tidak dapat dibedakan antara energi cahaya yang hilang

akibat penyerapan cahaya atau oleh hamburan. Oleh karena itu sampel dalam turbidimetri dikenai sinar dengan panjang gelombang dimana sampel tidak banyak menyerap pada panjang gelombang tersebut. Apabila larutan sampel berwarna maka absorbansi terkuat ada pada sinar tampak yang memiliki panjang gelombang yang sama dengan warna larutan sampel. Turbidimetri akan mengukur hamburan cahaya yang diteruskan (sudut 180°), sedangkan hamburan cahaya yang tegak lurus (90°) akan terdeteksi oleh nefelometer (Khopkar, 1990).

Pertumbuhan sel bakteri dapat diamati melalui beberapa metode antara lain : perhitungan secara langsung menggunakan mikroskop, menghitung koloni, pengukuran biomassa, dan hamburan cahaya (Koch, 2007). Hamburan cahaya merupakan metode yang banyak digunakan. Pada metode ini pengukuran dilakukan pada turbiditas atau jumlah cahaya yang dibelokkan oleh sel mikroba. Kelebihan dalam menggunakan turbidimeter adalah pengukuran yang cepat dan tidak merusak. Oleh karena itu turbidimeter dapat diaplikasikan untuk pengamatan kurva pertumbumbuhan bakteri (Maia, 2016).

2.10.3 LC-TOF/MS

Liquid Chromatography-Time of Flight/Mass Spectrometer (LC-TOF/MS) adalah gabungan dari instrumentasi *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan *Time of Flight Mass Spectrometer* (TOF MS) (Winefordner, 2009). LC-TOF/MS telah digunakan untuk menentukan kontaminan di dalam air dan sedimen melalui pengukuran massa molekul yang terprotonasi secara akurat. LC-TOF/MS banyak digunakan untuk analisis metabolit sekunder (de Vos dkk., 2007).

Kromatografi merupakan metode pemisahan fisik yang memisahkan komponen menjadi dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Fasa gerak adalah fasa yang bergerak dengan arah yang pasti melewati fasa diam. Fasa gerak dapat berupa cairan, gas dan cairan superkritis sedangkan fasa diam berupa padatan, gel atau cairan. Kromatografi terbagi menjadi empat bagian yaitu alat untuk sampel, fasa gerak, fasa diam, dan detektor. Fasa diam dan fasa gerak merupakan komponen yang berkaitan dengan proses pemisahan dalam kromatografi. Komponen dalam campuran akan mengalami pemisahan saat terjadi perbedaan interaksi dengan fasa gerak dan fasa diam di dalam kromatografi sehingga akan keluar dari kolom pada waktu yang berbeda-beda. Analit akan dipisahkan berdasarkan kepolarannya, analit yang terikat pada fasa gerak akan terbawa oleh fasa gerak dan mencapai detektor lebih dahulu. Analit yang terikat pada fasa diam tidak mengalami interaksi dengan fasa gerak dan akan tertahan dalam kolom. Fasa gerak pada *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) berupa cairan yang bergerak pada tekanan tinggi hingga mencapai 400 bar (4×10^7 Pa) sedangkan fasa diamnya berada dalam kolom yang dapat menahan tekanan tinggi.

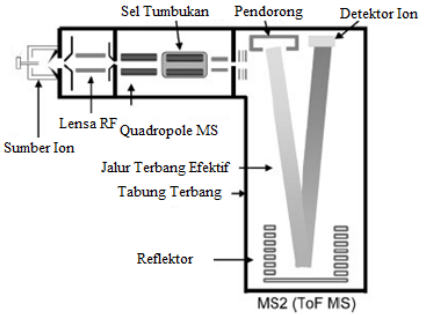
Pada LC-MS sebagian besar menggunkan teknik ionisasi lunak. Teknik ionisasi lunak akan menghasilkan ion yang memiliki rasio massa dengan muatan yang bernilai tinggi (m/z) dibandingkan fragmen ion yang memiliki nilai m/z yang rendah. Identifikasi melalui karakteristik retensi dianggap kurang akurat, karena terdapat kemungkinan lebih dari satu analit yang memiliki waktu retensi yang sama. Pemanfaatan spektrometer massa sebagai detektor dalam HPLC dapat mengidentifikasi senyawa hasil pemisahan dari kromatografi dengan lebih akurat. Spektrometri massa informasi tentang struktur dan berat molekul

analit. Metode ionisasi dalam LC-MS dapat berupa *electron ionization* (EI), *chemical ionization* (CI), *fast-atom bombardment* (FAB), *thermospray* (TSP), *electrospray* (ESI), dan *atmospheric-pressure chemical ionization* (APCI).

Ion-ion dari hasil metode ionisasi akan dipisahkan berdasarkan rasio m/z. *Time-of-flight mass spectrometer* adalah *mass analyzer* (TOF/MS) untuk memisahkan massa (mass separation device). Prinsip kerja alat ini adalah dengan memberikan energi kinetik yang sama pada tiap ion yang telah dihasilkan oleh spektrometer massa sehingga kecepatan tiap ion akan berbanding terbalik dengan kuadrat massanya. Akibatnya, waktu yang dibutuhkan oleh setiap ion untuk melewati *flight tube* spektrometer massa tergantung dari nilai m/z ion. Spektrum massa yang sempurna didapatkan dengan memberikan waktu yang cukup bagi semua ion untuk mencapai detektor. Pada instrumen TOF, ion semua rasio m/z dari sumber harus dipindahkan ke *mass analyzer* secara cepat dan bersamaan dalam kurun waktu yang telah diketahui sehingga *time flight* dan rasio m/z ion dapat ditentukan secara akurat. Salah satu keuntungan dalam penggunaan instrumen TOF adalah kemampuan *scanning* yang cepat, hal ini mendasari pengaplikasiannya dalam instrumentasi LC-MS (Ardrey, 2003).

TOF/MS dapat menghasilkan akurasi massa hingga < 2 ppm dengan rentang kalibrasi yang cukup memadai. Pengukuran massa yang akurat dapat memberikan informasi tentang komposisi unsur ion utama maupun ion hasil fragmentasi sehingga dapat digunakan untuk identifikasi spesies yang tidak diketahui (Lacorte, 2006).

Gambar 2.6 merupakan susunan komponen di dalam alat TOF-MS.



Gambar 2. 6 Skema Alat TOF-MS (Lacorte, 2006)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan dan instrumentasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu erlenmeyer berpenutup spons, erlenmeyer berpenutup kaca, gelas beker, gelas ukur, mikro pipet, cawan petri steril, corong kaca, jarum ose, tabung *falcon*, labu ukur 10 mL, neraca digital, *autoclave*, *centrifuge*, *shaker incubator*, inkubator, spektrofotometer UV-VIS *Genesys* 10S, LC-TOF MS (Bruker Impact HD).

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jamur *Phlebia brevispora*, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 3080, pewarna tekstil Metilen Biru (MB) dari SAP Chemicals dengan kemurnian 96%, *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), alkohol teknis, aquades, kertas saring Whattman dengan ukuran pori 20-25 μm.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Regenerasi bakteri *P. aeruginosa*

Bakteri *P. aeruginosa* sebanyak satu ose diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium NA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.2.2 Regenerasi jamur *P. brevispora*

Jamur *P. brevispora* diinokulasikan ke dalam cawan petri berisi medium PDA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C.

3.2.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *P. aeruginosa*

Bakteri *P.aeruginosa* hasil regenerasi di ambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan dalam 10 mL NB. Kultur bakteri diinkubasi di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan putaran 180 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 1 mL kultur bakteri dipindahkan ke dalam 500 mL media NB dan diukur densitas optiknya tiap satu jam sekali dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}). Kurva pertumbuhan dibuat dengan menggunakan data absorbansi sebagai fungsi waktu.

3.2.4 Persiapan Kultur Cair Jamur *P. brevispora*

Kultur jamur *P. brevispora* hasil regenerasi dan 25 ml aquades dihomogenasi menggunakan blender steril. Sebanyak 1 mL kultur jamur diinokulasikan ke dalam erlenmeyer yang berisi PDB dengan variasi volume 17, 15, 13, 11, dan 9 mL. Kultur cair jamur dipre-inkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari.

3.2.5 Persiapan Kultur Cair Bakteri *P. aeruginosa*

Bakteri *P. aeruginosa* sebanyak satu ose diinokulasikan ke dalam erlenmeyer berisi 10 mL NB dan dipre-inkubasi di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan putaran 180 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.2.6 Biodekolorisasi MB oleh Kultur Campuran Jamur *P. brevispora* dan Bakteri *P. aeruginosa* pada Media Cair

Pre-kultur jamur pada media cair dibuat terlebih dahulu. Kultur jamur yang telah di pre-inkubasi selama 7 hari

ditambahkan MB hingga mencapai konsentrasi akhir 100 mg/L dan bakteri *P. aeruginosa* dengan variasi volume: 2, 4, 6, 8, dan 10 mL (1 mL setara dengan $5{,}05 \times 10^{12}$ CFU). Kultur campuran yang telah ditambahkan MB diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Setelah proses inkubasi seluruh kultur campuran disentrifugasi dan diambil supernatannya. Absorbansi supernatan diukur menggunakan instrumen UV-Vis. Kontrol abiotik untuk pengukuran besar dekolorisasi dibuat dengan menambahkan MB ke dalam 20 mL PDB hingga mencapai konsentrasi 100 mg/L. Persen dekolorisasi pewarna MB dihitung menggunakan persamaan:

$$\% \text{ dekolorisasi} = \frac{Ak - At}{Ak} \times 100\%$$

Dimana :
Ak : Absorbansi kontrol (MB 100 mg/L)
At : Absorbansi sampel

(Nezamzadeh, 2014)

3.2.7 Analisis Biodegradasi MB dan Metabolit Produk

Kultur campuran hasil inkubasi dengan perlakuan variasi volume bakteri: 2, 4, 6, 8, dan 10 mL masing-masing disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dipisahkan dari miselium jamur dan biomassa bakteri menggunakan kertas saring Whattman 41 diameter 90 mm. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk analisis dekolorisasi dan produk metabolit sekunder. Supernatan kultur campuran dianalisis menggunakan instrumen LC-TOF/MS dengan *electrospray ionization* (ESI) pada range massa 50-1000. Metode gradien digunakan sebagai metode elusi dengan laju alir

0,2 mL/min pada tiga menit pertama dan tujuh menit berikutnya menggunakan laju alir 0,4 mL/min. Fase gerak yang digunakan adalah metanol dan air dengan perbandingan 99:1 pada tiga menit pertama dan 61:39 untuk tujuh menit sisanya. Kolom yang digunakan adalah kolom jenis Acclaim TM RSLC 120 C18 dengan ukuran 2, 1 x 100 mm pada suhu kolom 33°C.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Regenerasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

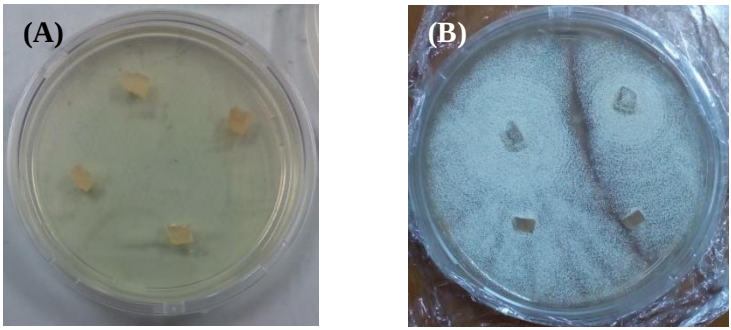
Penelitian ini menggunakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 3080 dari koleksi Laboratorium Kimia Mikroorganisme Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Seluruh alat gelas yang akan digunakan dalam proses regenerasi disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sebanyak satu ose bakteri stok diambil menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam media NA. Hasil inokulasi diinkubasi pada suhu 37°C. NA digunakan sebagai media untuk proses regenerasi bakteri karena mengandung pepton, ekstrak daging, NaCl, dan agar. Pepton dan ekstrak daging berfungsi sebagai sumber nitrogen, karbon,dan vitamin untuk pertumbuhan bakteri, sedangkan NaCl berfungsi untuk mengatur tekanan osmosis media (Nishiyama dkk., 2012). Hasil regenerasi bakteri *P. aeruginosa* pada media padat NA seperti pada Gambar 4.1

Gambar 4. 1 Hasil Regenerasi Bakteri *P. aeruginosa* Pada NA

Proses pemindahan bakteri stok ke media NA dilakukan di dalam *laminary flow* untuk mencegah adanya kontaminasi terhadap kultur bakteri.

4.2 Regenerasi Jamur *Phlebia brevispora*

Proses regenerasi dilakukan dengan menginokulasikan jamur *P. brevispora* ke dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) menggunakan jarum ose steril. PDA terdiri dari ekstrak kentang, dekstrosa, dan agar. Media PDA sesuai untuk digunakan sebagai media pertumbuhan jamur karena memiliki tingkat nilai pH yang rendah (pH 4,5-5,6) sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang membutuhkan kondisi netral untuk tumbuh (Cappuccino, 2014). Media PDA mengandung glukosa (2%), agar (1,5%), nitorgen, fosor, vitamin, dan mikronutrient lain yang berasal dari hasil ekstraksi kentang (57,5 g/L kentang di dalam media). PDA banyak digunakan sebagai media karena formulasinya yang sederhana dan dapat meningkatkan pertumbuhan miselium pada berbagai jenis jamur (Pradeep dkk., 2013). Hasil dari proses regenerasi jamur *P. brevispora* pada media padat agar selama 7 hari ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4. 2 Regenerasi Jamur *P. brevispora*: (A) kultur hari ke-0; (B) kultur hari ke-7

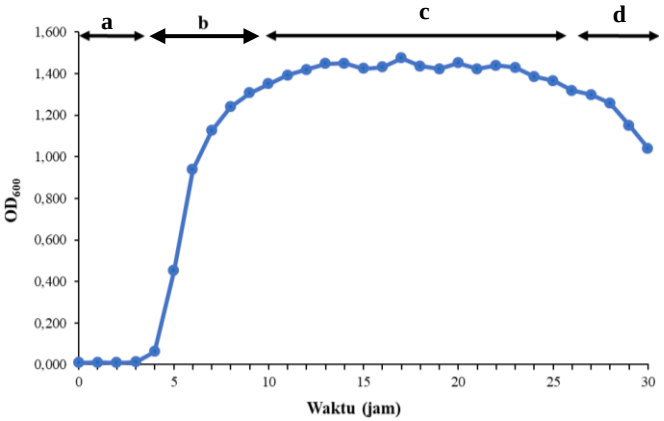
Jamur yang telah diinokulasikan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. dalam keadaan gelap. Miselium jamur telah tumbuh menutupi seluruh permukaan media PDA pada hari ke 7.

4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri *P. aeruginosa*

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui waktu dari fasa stasioner bakteri *P. aeruginosa*. Pada fase stasioner bakteri secara optimal menghasilkan metabolit sekunder yang dapat meningkatkan proses degradasi MB (Maier, 2009). Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan mengukur densitas optik bakteri menggunakan turbidimetri. Densitas optik (turbiditas) merupakan ukuran jumlah hamburan cahaya yang dihasilkan oleh kultur cair dan akan meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah sel dalam kultur (Madigan dkk., 2003). Pengukuran densitas optik bakteri pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}).

Pemindahan bakteri dari stok ke media baru bertujuan untuk mengaktifkan kembali sel bakteri. Bakteri dipindahkan sebanyak 1 mL ke dalam 500 mL media NB baru dan diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 30°C dan kecepatan putaran 180 rpm. Bakteri yang dipindahkan ke dalam media baru akan mengalami fase adaptasi terlebih dahulu untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan (Middelbeek dkk., 1992; Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Namun jika media pertumbuhan baru sama dengan media dan kondisi sebelumnya maka bisa jadi bakteri tidak memerlukan fasa adaptasi (Middelbeek dkk., 1992; Fardiaz, 1987). Absorbansi bakteri diukur tiap jam untuk mengetahui fase pertumbuhan dan pengukuran dihentikan ketika absorbansi mengalami penurunan atau bakteri telah mencapai fasa kematian.

Fase lag atau fase adaptasi dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke-4. Pada jam ke-5 hingga jam ke-11 bakteri memasuki fase logaritmik yang ditandai dengan peningkatan absorbansi. Pada fase logaritmik bakteri mengalami pembelahan dengan cepat dan konstan. Pada penelitian ini diperoleh data kurva pertumbuhan *P. aeruginosa* seperti pada Gambar 4.3



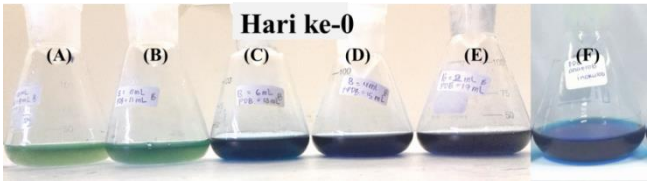
Gambar 4. 3 Kurva Pertumbuhan Bakteri *P. aeruginosa*. a. Fase lag, b. Fase log, c. Fase stasioner, d. Fase kematian (*decay*)

Bakteri berada pada fase stasioner pada jam ke-11 hingga jam ke-26. Fase stasioner ditandai dengan nilai absorbansi bakteri yang hampir sama sehingga menghasilkan kurva yang cenderung datar. Setelah fase logaritmik bakteri akan memasuki fasa stasioner dimana pertumbuhan bakteri relatif tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan sel yang mati. Laju pertumbuhan pada fasa stasioner pada akhirnya akan mengalami penurunan akibat berkurangnya vitamin dan unsur mineral (Sa'id, 1987; Judoamidjojo, 1990; Middelbeek dkk., 1992; Mangunwidjaja dan

Suryani, 1994; Gaman dan Sherrington, 1994). Penurunan absorbansi terjadi pada jam ke-30, hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri telah masuk ke dalam fase kematian.

4.4 Biodekolorisasi Metilen Biru oleh Bakteri *P. aeruginosa*

Biodekolorisasi MB oleh bakteri *P.aeruginosa* dilakukan pada media cair *Nutrient Broth* (NB). Bakteri *P. aeruginosa* diinokulasikan sebanyak satu ose ke dalam 10 mL PDB, kemudian diinkubasi di dalam *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan putaran 120 rpm. Setelah 24 jam bakteri dipindahkan ke dalam 150 mL NB. Kemudian bakteri diinokulasikan ke dalam media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) dengan variasi konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 mL (1 mL setara dengan $5{,}05 \times 10^{12}$ CFU). Larutan MB 2000 mg/L ditambahkan ke dalam kultur cair bakteri hingga konsentrasi akhir MB mencapai 100 mg/L. Kultur cair bakteri yang telah ditambahkan MB diinkubasi statis selama selama 7 hari pada suhu 30°C. Profil visualisasi dekolorisasi MB oleh *P. aeruginosa* pada hari ke-0 seperti pada Gambar 4.4



Gambar 4. 4 Dekolorisasi MB oleh *P. aeruginosa* pada PDB. (A) bakteri 10 mL, (B) bakteri 8mL, (C) bakteri 6 mL, (D) bakteri 4 mL, (E) bakteri 2 mL dan (F) Kontrol bakteri

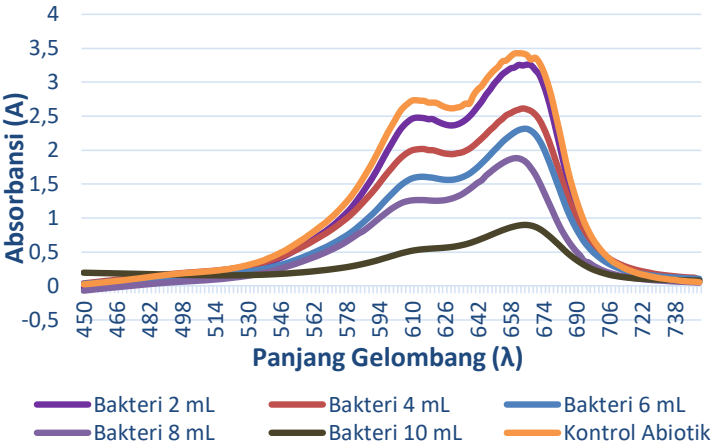
Pada hari ke-0 belum terjadi pemudaran warna MB pada variasi volume bakteri 2, 4, dan 6 mL, namun MB pada variasi volume 8 dan 10 mL mengalami pemudaran warna. Hal ini menunjukkan bahwa pada kedua variasi tersebut mulai terjadi dekolorisasi sesaat setelah penambahan MB. Proses dekolorisasi dapat terjadi karena aktivitas bakteri yang memanfaatkan MB sebagai sumber karbon untuk tumbuh, sehingga semakin banyak *P.aeruginosa* yang ada di dalam kultur menyebabkan warna MB semakin memudar (Eslami dkk., 2017).

Setelah proses inkubasi kultur cair bakteri yang mengandung MB disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450-750 nm. Profil visualisasi supernatan dari sampel tiap variasi volume bakteri seperti pada Gambar 4.5.

Gambar 4. 5 Profil sampel dekolorisasi MB oleh *P. aeruginosa* dengan volume bakteri (A) 2 mL, (B) 4 mL, (C) 6 mL, (D) 8 mL, (E) 10 mL dan (F) kontrol abiotik

Hasil analisis spektrofotometer UV-Vis menunjukkan bahwa pada sampel masih terdapat MB yang ditandai dengan munculnya puncak pada panjang gelombang 664 nm. Profil absorbansi hasil

analisis spektrofotometer UV-Vis seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4. 6 Profil Dekolorisasi MB oleh Bakteri *P.aeruginosa*

Adanya penurunan intensitas absorbansi menandakan bahwa MB pada tiap sampel telah mengalami proses dekolorisasi. Hal tersebut dikarenakan bakteri dapat menghasilkan enzim yang berperan dalam proses dekolorisasi. *Pseudomonas* sp. memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim lignilolitik yang berperan dalam memecah struktur lignin. Enzim ligninolitik dapat memecah pewarna senyawa dengan struktur yang mirip lignin seperti pewarna Azure B dan MB (Bandounas dkk., 2011).

Kemampuan dekolorisasi pada tiap variasi bakteri yang berbeda menimbulkan adanya perbedaan warna supernatan. Dekolorisasi secara kuantitatif dinyatakan melalui persen

dekolorisasi. Persentase dekolorisasi dapat dihitung dengan mengurangkan absorbansi kontrol pada λ_{max} dengan absorbansi perlakuan pada λ_{max} dibagi dengan absorbansi kontrol pada λ_{max} dan dikali dengan 100% (Gadd, 2001).

Dalam penelitian ini λ_{max} yang digunakan yaitu pada panjang gelombang 664 nm. Nilai absorbansi dan persen dekolorisasi *P. aeruginosa* disajikan dalam Tabel 4.1

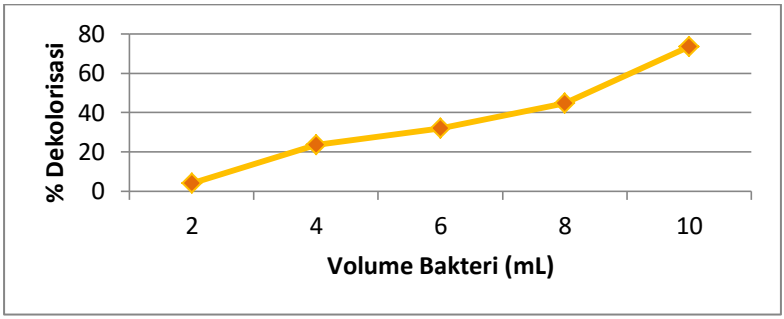
Tabel 4.1 Data Kuantitatif Biodekolorisasi MB oleh *P. aeruginosa*

Volume Bakteri (mL)	**Absorbansi Kontrol Abiotik**	**Absorbansi Sampel**	**% Dekolorisasi**
2	3,40	3,26	$4,12^{a} \pm 0,01$
4	3,40	2,60	$23,53^{b} \pm 0,71$
6	3,40	2,31	$32,06^{c} \pm 0,17$
8	3,40	1,88	$44,70^{d} \pm 0,17$
10	3,40	0,90	$73,53^{e} \pm 0,20$

Hasil uji T pada tiap persen dekolorisasi dengan derajat kebebasan $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar variasi volume bakteri yang ditandai dengan perbedaan alfabet.

Berdasarkan Tabel 4.1 nilai absorbansi sampel mengalami penurunan dengan bertambahnya volume bakteri.

Hubungan antara volume bakteri dan persen dekolorisasi dapat diketahui melalui grafik pada Gambar 4.7.



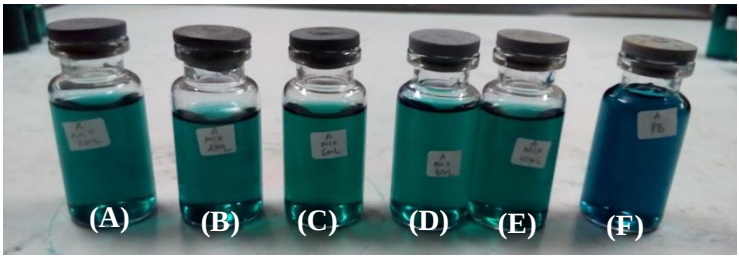
Gambar 4. 7 Trend Biodekolorisasi MB oleh *P.aeruginosa*

Pola grafik menunjukkan bahwa hubungan antara volume bakteri dengan persen dekolorisasi berbanding lurus. Hal tersebut dikarenakan persen dekolorisasi cenderung meningkat dengan penambahan volume bakteri.

4.5 Biodekolorisasi Metilen Biru oleh Kultur Campuran Bakteri *P. aeruginosa* dan Jamur *P. brevispora*

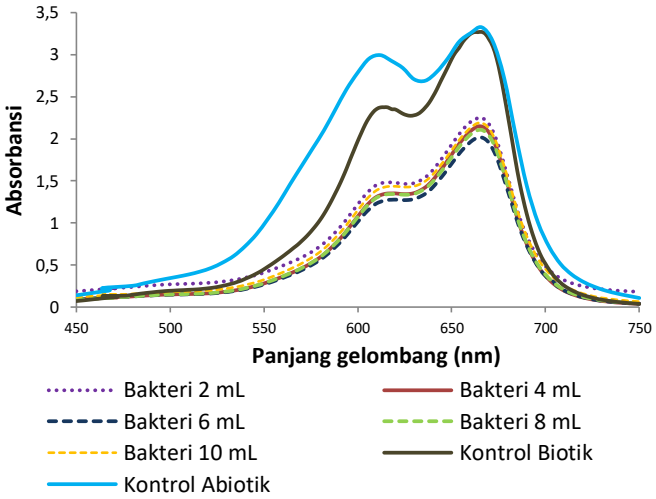
Proses biodekolorisasi MB oleh kultur campuran bakteri *P.aeruginosa* dan jamur *P. brevispora* dilakukan pada media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB). Mula-mula hasil regenerasi jamur *P. brevispora* dihomogenasi dengan blender, kemudian diinokulasikan ke dalam erlenemyer yang berisi PDB sebanyak 1 mL dan di pre-inkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 7 hari. PDB dipilih sebagai media karena mengandung mikronutien atau ion logam yang sesuai untuk kerja enzim dan meningkatkan metabolit pertumbuhan (Pradeep dkk., 2013). Setelah pre-inkubasi selama 7 hari kultur cair jamur *P. brevispora* ditambahkan bakteri *P. aeruginosa* dengan variasi konsentrasi

sebesar 2, 4, 6, 8, dan 10 mL (1 mL setara dengan $5{,}05x10^{12}$ CFU). Larutan MB 2000 mg/L ditambahkan hingga konsentrasi akhir MB yang terdapat di dalam kultur campuran mencapai 100 mg/L. Kemudian kultur campuran diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Dilakukan pengamatan terhadap kemampuan dekolorisasi kultur campuran pada tiap variasi konsentrasi bakteri *P. aeruginosa*. Selain kultur campuran, kontrol biotik dibuat dengan menambahkan 2000 mg/L MB ke dalam kultur cair jamur *P. brevispora* hingga konsentrasi akhir di dalam kultur jamur mencapai 100 mg/L. Pada hari ke-7 setelah penambahan MB dilakukan analisis UV-Vis untuk mengetahui kemampuan kultur campuran bakteri *P. aeruginosa* dan jamur *P. brevispora* dalam mendekolorisasi MB. Analisis diawali dengan memisahkan biomassa dengan kultur cair yang mengandung MB dengan menggunakan alat sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Gambar 4.8 merupakan profil visualisasi dekolorisasi MB oleh kultur campuran dan kontrol biotik jamur *P. brevispora* pada media PDB dengan waktu inkubasi 7 hari. MB mengalami pemudaran pada tiap sampel kultur campuran.



Gambar 4. 8 Dekolorisasi MB oleh kultur campuran pada PDB. (a) bakteri 2 mL, (b) bakteri 4 mL, (c) bakteri 6 mL, (d) bakteri 8 mL, (e) bakteri 10 mL, (f) kontrol biotik jamur *P. brevispora*.

Supernatan yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode *scanning* pada panjang gelombang 450-750 nm. Analisis spektrofotometri juga dilakukan pada kontrol abiotik yang berupa campuran antara PDB dengan MB untuk mengetahui profil absorbansi awal MB sebelum mengalami dekolorisasi. Dari hasil analisis tersebut diperoleh profil absorbansi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4. 9 Profil Dekolorisasi oleh Kultur Campuran Bakteri *P. aeruginosa* dan jamur *P.brevispora*

Profil absorbansi menunjukkan bahwa pada sampel masih terdapat MB yang ditandai dengan munculnya puncak pada panjang gelombang 664 nm. Berdasarkan profil absorbansi diketahui bahwa absorbansi MB pada kontrol biotik jamur *P. brevispora* mengalami penurunan dibandingkan dengan kontrol abiotik, kemudian pada sampel kultur campuran kembali terjadi

penurunan absorbansi MB. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan bakteri *P. aeruginosa* ke dalam kultur cair jamur *P. brevispora* dapat meningkatkan proses dekolorisasi MB. Berdasarkan profil absorbansi dapat diketahui bahwa absorbansi MB pada sampel dengan volume bakteri 2 mL mengalami penurunan dibandingkan dengan kontrol biotik. Pada variasi volume bakteri 4 mL dan 6 mL, profil absorbansi MB kembali mengalami penurunan yang disebabkan adanya peningkatan jumlah bakteri sehingga jumlah organisme yang mendekolorisasi MB bertambah. Pada variasi volume bakteri 8 mL hingga 10 mL terjadi peningkatan absorbansi MB.

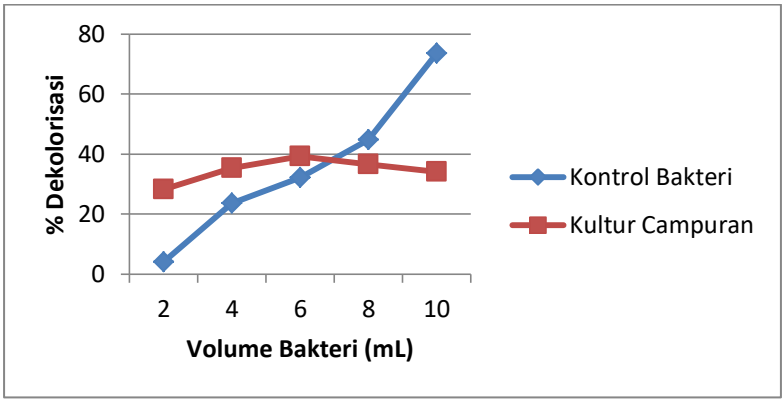
Kemampuan kultur campuran bakteri *P. aeruginosa* dan jamur *P. brevispora* mendekolorisasi MB secara kuantitatif ditentukan dengan cara mengukur persentase dekolorisasinya dan diperoleh hasil seperti pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Degradasi Metilen Biru oleh Kultur Campuran Bakteri *P. aeruginosa* dan Jamur *P. brevispora*

Konsentrasi Bakteri (mL)	**Absorbansi Kontrol Abiotik**	**Absorbansi Sampel**	**% Dekolorisasi**
Kontrol Biotik	3,32	3,27	$1,58^{a} \pm 0,04$
2	3,32	2,38	$28,17^{b} \pm 0,09$
4	3,32	2,15	$35,31^{c} \pm 0,14$
6	3,32	2,02	$39,28^{c} \pm 0,06$
8	3,32	2,10	$36,65^{d} \pm 0,01$
10	3,32	2,19	$34,11^{d} \pm 0,11$

Hasil uji T pada tiap persen dekolorisasi dengan derajat kebebasan $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar variasi volume bakteri yang ditandai dengan perbedaan alfabet.

Berdasarkan data absorbansi diatas dapat diketahui bahwa absorbansi terkecil diperoleh pada sampel kultur campuran dengan variasi konsentrasi bakteri 6 mL. Persentase dekolorisasi tertinggi ada pada kultur campuran variasi volume bakteri 6 mL dengan persentase dekolorisasi sebesar 39,28 %. Pola absorbansi MB dari tiap variasi konsentrasi bakteri seperti pada Gambar 4.10

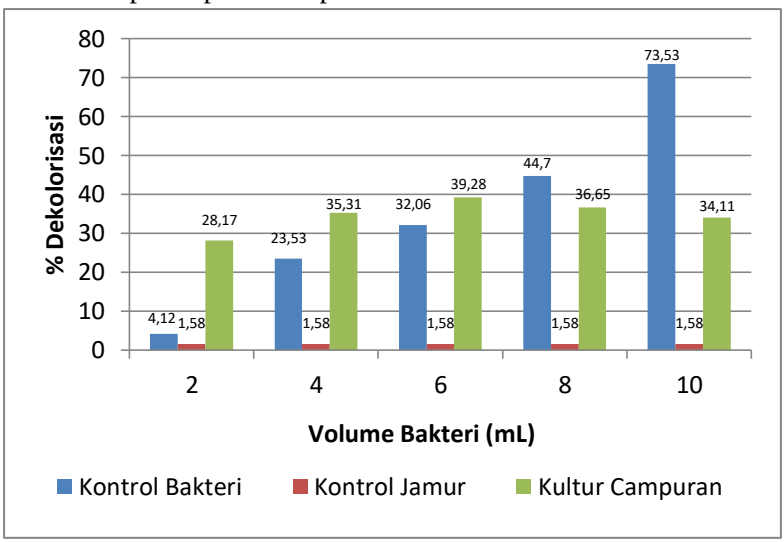


Gambar 4. 10 Persentase Biodekolorisasi MB oleh Kontrol Bakteri (*P. aeruginosa*) dan Kultur Campuran (*P. aeruginosa* dan *P. brevispora*)

Pola dekolorisasi oleh *P.aeruginosa* cenderung naik pada setiap penambahan bakteri. Pada kultur campuran pola dekolorisasi meningkat hingga variasi volume bakteri 6 mL dan mengalami penurunan pada penambahan volume bakteri yang berikutnya. Dari grafik tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan kultur campuran *P. aeruginosa* dan *P. brevispora* dapat meningkatkan kemampuan dekolorisasi MB dengan volume bakteri optimum pada 6 mL. Pada penambahan volume bakteri melebihi 6 mL akan terjadi penurunan dekolorisasi pada kultur campuran. Hal tersebut menunjukkan bahwa proses dekolorisasi

MB oleh kultur campuran tidak terus meningkat seiring dengan penambahan volume bakteri.

Gambar 4.11 merupakan grafik batang untuk membandingkan persentase dekolorisasi pada kontrol bakteri, kontrol jamur, dan kultur campuran pada setiap variasi volume bakteri.



Gambar 4. 11 Persentase Biodekolorisasi MB oleh Kontrol Bakteri (*P. aeruginosa*), kontrol jamur (*P. brevispora*), Kultur Campuran (*P. aeruginosa* dan *P. brevispora*)

Berdasarkan grafik tersebut terlihat bahwa penambahan bakteri pada volume 2, 4, dan 6 mL dapat meningkatkan kemampuan dekolorisasi pada kultur campuran. Penambahan bakteri sebanyak 2 mL dapat menghasilkan persentase dekolorisasi yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kultur yang hanya berisi *P.aeruginosa* atau *P. brevispora* saja. Dekolorisasi pada kultur campuran terus meningkat seiring dengan penambahan volume bakteri hingga pada volume bakteri

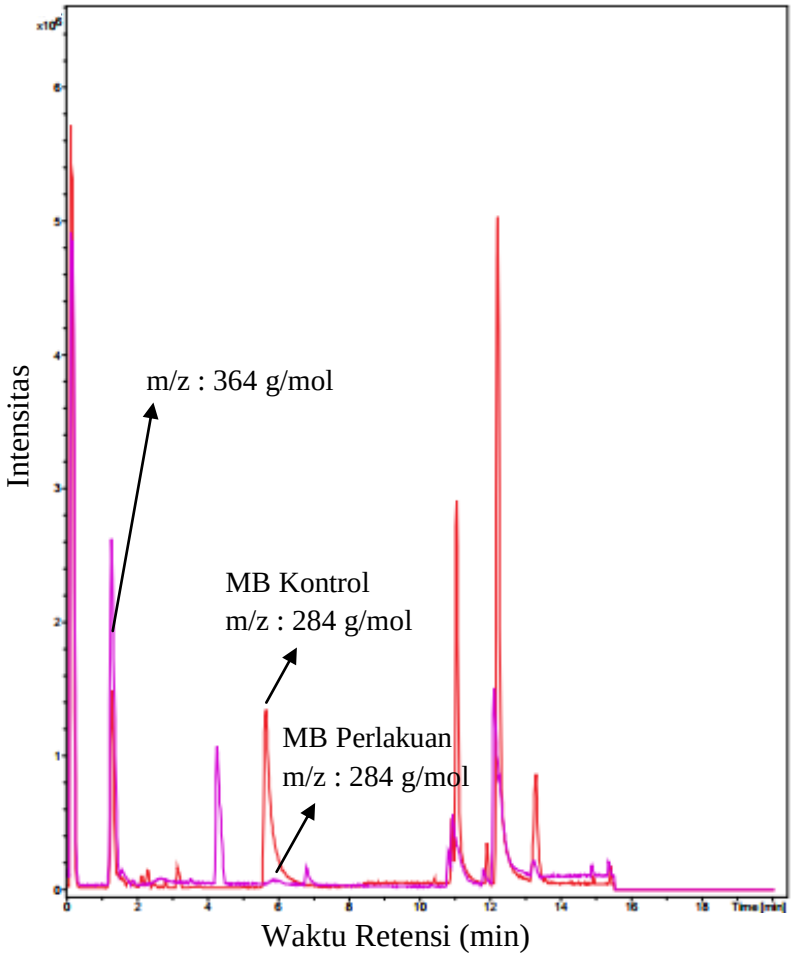
6 mL dan diperoleh persen dekolorisasi tertinggi MB sebesar 39,28%. Grafik menunjukkan bahwa kultur campuran dengan volume bakteri 2, 4, dan 6 mL memiliki persentase dekolorisasi yang lebih tinggi dibandingkan kultur yang berisi bakteri dan jamur saja. Hal ini menunjukkan bahwa pada ketiga variasi tersebut bakteri dan jamur bekerja secara sinergis untuk mendekolorisasi MB. Pada penambahan volume bakteri 8 dan 10 mL pada kultur campuran terjadi penurunan persentase dekolorisasi, sedangkan pada kontrol bakteri terjadi kenaikan persen dekolorisasi pada kedua variasi tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan *P. aeruginosa* dalam jumlah yang berlebih akan menghambat kinerja jamur dalam mendekolorisasi MB. Hal tersebut dapat terjadi karena bakteri *P.aeruginosa* dapat menghasilkan *phenazine* yang dapat bersifat antifungal (morales dkk., 2010). Akibatnya kinerja jamur akan terhambat pada kedua volume bakteri tersebut dan proses dekolorisasi MB tidak berlangsung secara optimal. Interaksi antara *P. aeruginosa* dan *P. brevispora* telah diselidiki dengan menumbuhkan kedua organisme dalam media agar yang sama dan diamati pertumbuhannya. Gambar 4.12 menunjukkan interaksi antara *P.aeruginosa* dengan *P. brevispora*.

Gambar 4. 12 Interaksi antara *P. aeruginosa* dan *P. brevispora*

Pada Gambar 4.12 terlihat bahwa adanya *P. aeruginosa* pada media tidak menghambat pertumbuhan *P. brevispora*. Miselium jamur dapat tumbuh memenuhi cawan petri. Interaksi *P. aeruginosa* dan *P. brevispora* berlangsung secara sinergis terlihat dengan dengan adanya miselium jamur yang tumbuh mengelilingi koloni bakteri.

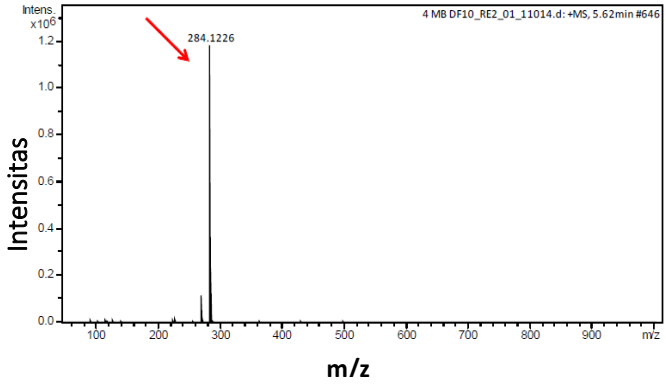
4.6 Analisis Produk Metabolit Hasil Biodekolorisasi MB Oleh Kultur Campuran *P. aeruginosa* dan *P. brevispora* Menggunakan LC-TOF/MS

Produk metabolit hasil biodekolorisasi MB dianalisis menggunakan instrumentasi LC-TOF/MS. Pada kromatogram hasil analisis LC-TOF/MS terdapat puncak yang sama antara kontrol dan perlakuan pada yang muncul pada waktu retensi 5,86 Berdasarkan data TOF/MS nya senyawa yang muncul pada waktu retensi 5,86 memiliki m/z 284 yang merupakan berat molekul senyawa MB. Intensitas puncak MB pada kromatogram perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan intensitas puncak MB kontrol. Hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi proses dekolorisasi MB pada kultur perlakuan MB. Pada kromatogram perlakuan muncul puncak baru yang tidak terdapat pada kromatogram kontrol yang diduga sebagai metabolit produk yang dihasilkan selama proses dekolorisasi. Puncak baru pada kromatogram perlakuan muncul pada waktu retensi 1,29. Gambar 4.13 merupakan kromatogram hasil analisis menggunakan LC-TOF/MS.



Gambar 4. 13 Kromatogam Hasil Dekolorisasi MB oleh Kultur Campuran Bakteri *P. aeruginosa* dan Jamur *P. brevispora* selama 7 hari. Kromatogram Kontrol (Merah), Kromatogram Perlakuan (Pink)

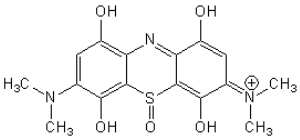
Spektra MS dari senyawa MB dapat dilihat pada Gambar 4.14



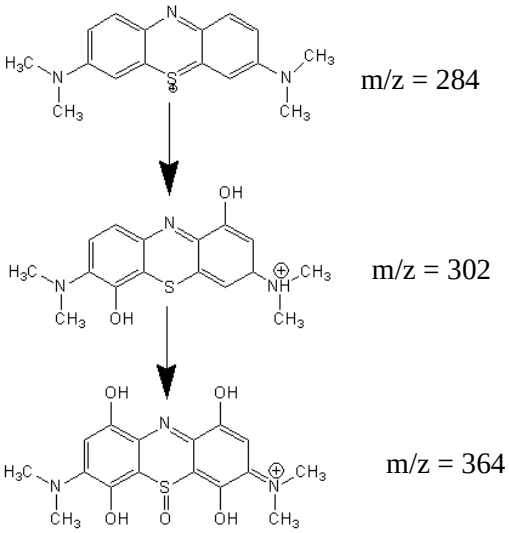
Gambar 4. 14 Spektra MS Senyawa Metilen Biru

Berdasarkan data TOF-MS, puncak pada waktu retensi 1,29 menit memiliki m/z 364 dan diperkirakan merupakan senyawa dengan rumus molekul $C_{16}H_{18}N_3O_5S$. Struktur senyawa tersebut seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Metabolit Hasil Dekolorisasi MB oleh Kultur Campuran

Waktu Retensi (min)	Massa Molekul	Rumus Molekul	Struktur Molekul
1,29	364	$C_{16}H_{18}N_3O_5S$	

Pada penelitian oleh Zhi, dkk (2018) menemukan bahwa senyawa tersebut muncul pada proses dekoloriasasi MB dengan menggunakan komposit partikel MnO_2-MCP/NAClO. Jalur transformasi MB yang diusulkan pada penelitian tersebut seperti pada Gambar 4.15.



Gambar 4. 15 Jalur Transformasi MB oleh Kultur Campuran (Zhi dkk., 2018)

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kultur campuran *P. aerugionosa* dan *P. brevispora* mampu mendekolorisasi pewarna Metilen Biru sebesar 39,28% dengan penambahan bakteri 6 mL (1 mL= 5,05 x 10^{12} CFU) pada media cair PDB dan waktu inkubasi selama 7 hari. Proses dekolorisasi Metilen Biru oleh kultur campuran menghasilkan senyawa metabolit dengan rumus molekul $C_{16}H_{18}N_3O_5S$.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan variasi waktu inkubasi pada proses dekolorisasi MB oleh kultur campuran *P. aeruginosa* dan *P. brevispora*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

Aksu, Z., & Dönmez, G. (2005). Combined effects of molasses sucrose and reactive dye on the growth and dye bioaccumulation properties of Candida tropicalis. *Process Biochemistry*, *40*(7), 2443-2454.

An, S. Y., Min, S. K., Cha, I. H., Choi, Y. L., Cho, Y. S., Kim,C. H., et al. (2002). Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by Citrobacter sp. *Biotechnology Letters*, *24*, 1037– 1040.

Ardrey, R. E. (2003). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry : an Introduction.* England: Wiley Inc Publication.

Bae, J. S., & Freeman, H. S. (2007). Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments*, *73*(1), 81-85.

Baldrian, P. (2004). Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *Fems microbiology ecology*, *50*(3), 245-253.

Bandounas, L., Wierckx, N. J., de Winde, J. H., & Ruijssenaars, H. J. (2011). Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *Bmc Biotechnology*, *11*(1), 94.

Boominathan, K., & Reddy, C. A. (1992). cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(12), 5586-5590.

Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2012). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book*. Elsevier Health Sciences.

Buswell, J. A., Odier, E., & Kirk, T. K. (1987). Lignin biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology*, *6*(1), 1-60.

Cappuccino J. G., & Sherman, N. (2014). Microbiology: A Laboratory Manual. USA: Pearson Education, Inc.

Chander, M., & Kaur, I. (2015). An Industrial Dye Decolourisation by *Phlebia* sp. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, *4*(5), 217-226.

Chen, C. H., Chang, C. F., Ho, C. H., Tsai, T. L., & Liu, S. M. (2008). Biodegradation of crystal violet by a Shewanella sp. NTOU1. *Chemosphere*, *72*(11), 1712-1720.

Christie, R. M. (2001). *Colour chemistry*. Royal Society of Chemistry.

Cragan, J. D. (1999). Teratogen update: methylene blue. *Teratology*, *60*(1), 42-48.

De Vos, R. C., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J., Bino, R. J., & Hall, R. D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*, *2*(4), 778.

Diez, M. C. (2010). Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. *Journal of soil science and plant nutrition*, *10*(3), 244-267.

Faber, P., Ronald, A., & Millar, B. W. (2005). Methylthioninium chloride: pharmacology and clinical applications with special emphasis on nitric oxide mediated vasodilatory shock during cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia*, *60*(6), 575-587.

Fan, H. J., Huang, S. T., Chung, W. H., Jan, J. L., Lin, W. Y., & Chen, C. C. (2009). Degradation pathways of crystal violet by Fenton and Fenton-like systems: condition optimization and intermediate separation and identification. *Journal of hazardous materials*, *171*(1-3), 1032-1044.

Fardiaz, S. (1987). Fisiologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. 186 hlm

Fonseca, M. I., Fariña, J. I., Castrillo, M. L., Rodríguez, M. D., Nuñez, C. E., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2014). Biopulping of wood chips with *Phlebia brevispor*a BAFC

633 reduces lignin content and improves pulp quality. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *90*, 29-35.

Forgacs, E., Cserhati, T., & Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment international*, *30*(7), 953-971.

Fu, Y., & Viraraghavan, T. (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource technology*, *79*(3), 251-262.

Gadd, G. M., & Gadd, G. M. (Eds.). (2001). *Fungi in bioremediation* (No. 23). Cambridge University Press.

Gaman, P.M. dan K.B. Sherrington. 1994. Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 317 hlm.

Ghaedi, M., Pakniat, M., Mahmoudi, Z., Hajati, S., Sahraei, R., & Daneshfar, A. (2014). Synthesis of nickel sulfide nanoparticles loaded on activated carbon as a novel adsorbent for the competitive removal of methylene blue and safranin-O. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *123*, 402-409.

Glenn, J. K., & Gold, M. H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(6), 1741-1747.

Gorog, S. (2018). *Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis: 0*. CRC press.

Hamdaoui, O., & Chiha, M. (2007). Removal of Methylene Blue from Aqueous Solutions by Wheat Bran. *Acta Chimica Slovenica*, *54*(2).

Harmita, A. P. (2006). *Analisa Fisiko Kimia*. Jakarta: UI Press.

Heinfling, A., Bergbauer, M., & Szewzyk, U. (1997). Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*(2), 261-266.

Hiscox, J., Baldrian, P., Rogers, H. J., & Boddy, L. (2010). Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genetics and Biology*, *47*(6), 562-571.

Houas, A., Lachheb, H., Ksibi, M., Elaloui, E., Guillard, C., & Herrmann, J. M. (2001). Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water. *Applied Catalysis B: Environmental*, *31*(2), 145-157.

http://eol.org/pages/302170/hierarchy_entries/51027419/overview
diakses pada tanggal 20 Juni 2018

Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Lee, G. W., Im, K. H., Hur, H., Lee, M. W., ... & Lee, T. S. (2008). Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes. *Mycobiology*, *36*(2), 114-120.

Judoamidjojo, M., A.A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1990. Teknolologi Fermentasi. Rajawali Pers. Jakarta. 333 hlm

Justo, A., Miettinen, O., Floudas, D., Ortiz-Santana, B., Sjökvist, E., Lindner, D., ... & Hibbett, D. S. (2017). A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). *Fungal biology*, *121*(9), 798-824.

Kamei, I., & Kondo, R. (2006). Simultaneous degradation of commercially produced CNP herbicide and of contaminated dioxin by treatment using the white-rot fungus *Phlebia brevispora*. *Chemosphere*, *65*(7), 1221-1227.

Kapdan, I. K., Kargi, F., McMullan, G., & Marchant, R. (2000). Decolorization of textile dyestuffs by a mixed bacterial consortium. *Biotechnology Letters*, *22*(14), 1179-1181.

Kar, A. (2005). Pharmaceutical drug analysis. New Age International.

Karamalidis, A. K., Evangelou, A. C., Karabika, E., Koukkou, A. I., Drainas, C., & Voudrias, E. A. (2010). Laboratory

scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. *Bioresource technology*, *101*(16), 6545-6552.

Keck, A., Rau, J., Reemtsma, T., Mattes, R., Stolz, A. & Klein, J. (2002). Identification of quinoide redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Sphingomonas xenophaga* BN6, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 9, pp. 4341–4349

Khan, A. A., & Husain, Q. (2007). Decolorization and removal of textile and non-textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent by using potato (*Solanum tuberosum*) soluble and immobilized polyphenol oxidase. *Bioresource Technology*, *98*(5), 1012-1019.

Khopkar. 1990. Konsep Dasar Kimia Analisa, Penerbit UI Press : Jakarta hal 207 – 213.

Khopkar, S. M. (2003). Konsep Dasar Kimia Analitik. UI-Press

Kirk, T. K., & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic" combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews in Microbiology*, *41*(1), 465-501.

Knapp, J. S., Newby, P. S., & Reece, L. P. (1995). Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, *17*(7), 664-668.

Knapp, J. S. (2001). Use of wood-rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial. *Fungi in bioremediation*, (23), 242.

Koch, A. L. (2007). Growth measurement. In *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition* (pp. 172-199). American Society of Microbiology.

Kodam, K. M., Soojhawon, I., Lokhande, P. D., & Gawai, K. R. (2005). Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. *World journal of microbiology and biotechnology*, *21*(3), 367-370.

Koneman. 1994. *Webster's New Encyclopedia Dictionary*. US of America : Simon and Schuster

Kuhad, R. C., Sood, N., Tripathi, K. K., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Advances in applied microbiology*, *56*, 185.

Lacorte, Silvia, Alba, & Amadeo, R. (2006). *Time of Flight Mass Spectrometry Applied to The Liquid Chromatographic Analysis of Pesticides in Water and Food*. Wiley Inter Science.

Lade, H., Kadam, A., Paul, D., & Govindwar, S. (2016). Exploring the potential of fungal-bacterial consortium for low-cost biodegradation and detoxification of textile effluent. *Archives of Environmental Protection*, *42*(4), 12-21.

Lee, A. H., Jang, Y., Kim, G. H., Kim, J. J., Lee, S. S., & Ahn, B. J. (2017). Decolorizing an anthraquinone dye by *Phlebia brevispora*: Intra-species characterization. *Engineering in Life Sciences*, *17*(2), 125-131.

Lundblad, R. L., & Macdonald, F. (Eds.). (2018). *Handbook of biochemistry and molecular biology*. CRC Press.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Microbial growth. *Brock biology of microorganisms*, 137-166.

Maia, M. R., Marques, S., Cabrita, A. R., Wallace, R. J., Thompson, G., Fonseca, A. J., & Oliveira, H. M. (2016). Simple and versatile Turbidimetric monitoring of bacterial growth in liquid cultures using a customized 3D printed culture tube holder and a miniaturized spectrophotometer: application to facultative and strictly anaerobic bacteria. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1381.

Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., (2009), *Environmental Microbiology second Editio,* Academic Press Elsevier, UK.

Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment international*, *30*(2), 261-278.

Mangunwidjaja, D. dan A. Suryani. (1994). Teknologi Bioproses. Penerbit Swadaya. Jakarta.. 394 hlm

Marinescu, M., Dumitru, M., & Lăcătuşu, A. R. (2009). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an artificial polluted soil. *Research Journal of Agricultural Science*, *41*(2), 157-162.

Martani, E., A.T. Utami dan S. Hartadi. (2003). Biodegradasi Zat Pencelup Malachite Green Oleh Jamur Pembusuk Putih. *J. Manusia dan Lingkungan*. 18: 16-27

Maurya, N. S., Mittal, A. K., Cornel, P., & Rother, E. (2006). Biosorption of dyes using dead macro fungi: effect of dye structure, ionic strength and pH. *Bioresource technology*, *97*(3), 512-521.

McMahon, G. (2008). Analytical instrumentation: a guide to laboratory, portable and miniaturized instruments. John Wiley & Sons.

Middlebeek, E.J., R.O. Jenkins and J.S. Drijver-de Haas. (1992). Growth in batch culture. In Vitro Cultivation of Micro-organisms. Biotechnology by Open Learning.

Migula, W. (1900). System der Bakterien, vol. 2. *Gustav Fisher, Jena, Germany*.

Mishra, G., & Tripathy, M. (1993). A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage*, *40*, 35-35.

Moreira, M. T., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2000). Manganese peroxidase production by *Bjerkandera* sp. BOS55. *Bioprocess Engineering*, *23*(6), 657-661.

Mulja, M., & Suharman. (1995). *Analisis Instrumental.* Airlangga University Press: Surabaya.

Nazina, T. N., Sokolova, D. S., Shestakova, N. M., Grigoryan, A. A., Mikhailova, E. M., Babich, T. L., ... & Ni, F. (2005). The phylogenetic diversity of aerobic organotrophic bacteria from the Dagang high-temperature oil field. *Microbiology*, *74*(3), 343-351.

Nezamzadeh, Alireza, Shamsabadi. (2014). Comparison of Photocatalytic Efficiency of Supported CuO onto Microand Nano Particles of Zeolite X in Photo

Decolorization of Methyleneblue and Methyl Orange Aqueous Mixture. Applied Catalysis A: General 477 (2014) 83–92.

Nietzki, R. (1888). Chemistry of The Organic Dyestuffs. Gurney & Jackson Publishing. California.

photocatalytic process. *Journal of Environmental Sciences*.

Nigam, P., McMullan, G., Banat, I. M., & Marchant, R. (1996). Decolorization of effluent from the textile industry by a microbial consortium. *Biotechnology Letters, 18*(1), 117–120

Nishiyama, H., Saito, R., Chida, T., Sano, K., Tsuchiya, T., & Okamura, N. (2012). Nutrient agar with sodium chloride supplementation for presumptive detection of Moraxella catarrhalis in clinical specimens. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *18*(2), 219-227.

Noraini, C. H. C., Morad, N., Norli, I., Teng, T. T., & Ogugbue, C. J. (2012). Methylene blue degradation by *Sphingomonas paucimobilis* under aerobic conditions. *Water, Air, & Soil Pollution*, *223*(8), 5131-5142.

Novotný, Č., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Šašek, V., & Molitoris, H. P. (2001). Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*, *89*(2-3), 113-122.

Ollikka, P., Alhonmäki, K., Leppänen, V. M., Glumoff, T., Raijola, T., & Suominen, I. (1993). Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, *59*(12), 4010-4016.

Pearce, C. I., Lloyd, J. R., & Guthrie, J. T. (2003). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and pigments*, *58*(3), 179-196.

Pourbabaee, A. A., Malekzadeh, F., Sarbolouki, M. N., & Najafi, F. (2006). Aerobic decolorization and detoxification of a disperse dye in textile effluent by a new isolate of *Bacillus* sp. *Biotechnology and bioengineering*, *93*(4), 631-635.

Pradeep, F. S., Begam, M. S., Palaniswamy, M., & Pradeep, B. V. (2013). Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. *World Applied Sciences Journal*, *22*(1), 70-77.

Pramila, R., Padmavathy, K., Ramesh, K. V., & Mahalakshmi, K. (2012). *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumanni*i and *Pseudomonas citronellolis* - Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). *African Journal of Bacteriology Research*, *4*(1), 9-14.

Reddy, C. A., & Mathew, Z. A. C. H. A. R. I. A. (2001). Bioremediation potential of white rot fungi. In *British Mycological Society Symposium Series* (Vol. 23, pp. 52-78).

Riyanto & Tatang Shabur Julianto. (2006). Degradasi Senyawa Metilen Biru dengan Metode Elektrolisis Menggunakan Elektroda Platinum. Jurnal Universitas Islam Indonesia. UII. Yogyakarta.

Rizqi, H. D., & Purnomo, A. S. (2017). The ability of brown-rot fungus *Daedalea dickinsii* to decolorize and transform methylene blue dye. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33:92

Robertson, L. A., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadioetomo, R., & Kuenen, J. G. (1989). Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek*, *56*(4), 289-299.

Rogalski J, Lundell T, Leonowicz A, Hatakka A (1991) Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes*

versicolor depending on culture conditions. *Acta Microbiol. Polonica* **40**: 221–234.

Rohman, A. (2007). Kimia Farmasi Analisis , Yogyakarta : Pustaka Pelajar.

Sa'id, E.G. 1987. Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi. PT. Melton Putra. Jakarta. 317 hlm.

San, N. O., Celebioglu, A., Tümtaş, Y., Uyar, T., & Tekinay, T. (2014). Reusable bacteria immobilized electrospun nanofibrous webs for decolorization of methylene blue dye in wastewater treatment. *RSC Advances*, *4*(61), 32249-32255

Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *42*(1), 138-157.

Sarioglu, O. F., San Keskin, N. O., Celebioglu, A., Tekinay, T., & Uyar, T. (2017). Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *152*, 245-251.

Sauer, T., Neto, G. C., Jose, H. J., & Moreira, R. F. P. M. (2002). Kinetics of photocatalytic degradation of reactive dyes in a TiO2 slurry reactor. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *149*(1-3), 147-154.

Seshadri, S., Bishop, P. L., & Agha, A. M. (1994). Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. *Waste Management*, *14*(2), 127-137.

Shah, V., & Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian journal of microbiology*, *48*(10), 857-870.

Sharma, D. K., Saini, H. S., Singh, M., Chimni, S. S., & Chandha, B. S. (2004). Isolation and characterization of microorganisms capable of decolorizing various

triphenylmethane dyes. *Journal Basic Microbiology, 44*(1), 59–65.

Singh, H. (2006). *Mycoremediation: fungal bioremediation*. John Wiley & Sons.

Skoog, Douglas, A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (1998). *Principles of Instrrumental Analysis sixth Edition*. Canada: Thomson Brooks/Cole.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. (2013). *Fundamentals of analytical chemistry*. Nelson Education.

Solís, M., Solís, A., Pérez, H. I., Manjarrez, N., & Flores, M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochemistry*, *47*(12), 1723-1748.

Su, W. T., & Lin, C. H. (2013). Fungal–bacterial synergism enhanced decolorization of reactive red 120 by response surface methodology. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *82*, 1-8.

Tarawou, T., & Horsfall Jr, M. (2007). Adsorption of methylene blue dye on pure and carbonized water weeds. *Bioremediation journal*, *11*(2), 77-84.

Todar, K. (2004). Pseudomonas and related bacteria. Todar's online text book of bacteriology.

Tony, B. D., Goyal, D., & Khanna, S. (2009). Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *63*, 62–469.

Vara, J., & Ortiz, C. S. (2016). Thiazine dyes: Evaluation of monomeric and aggregate forms. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *166*, 112-120.

Wang, Y., & Yu, J. (1998). Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of Trametes versicolor. *Water Science and Technology*, *38*(4-5), 233-238.

Wang, J., Gao, F., Liu, Z., Qiao, M., Niu, X., et al. (2012). Pathway and Molecular Mechanisms for Malachite Green Biodegradation in Exiguobacterium sp. MG2. *PLoS ONE, 7*(12), e51808.

Wang, X., Bi, W., Zhai, P., Wang, X., Li, H., Mailhot, G., & Dong, W. (2016). Adsorption and photocatalytic degradation of pharmaceuticals by BiOClxIy nanospheres in aqueous solution. *Applied Surface Science*, *360*, 240-251.

Welham, A., 2000. The theory of dyeing (and the secret of life). J. Soc. Dyers Colour. 116, 140–143.

Widjajanti, E., Regina Tutik, P., & Utomo, M. P. (2011). Pola Adsorpsi Zeolit Terhadap Pewarna Azo Metil Merah dan Metil Jingga. In *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA. hal K115-K122, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta*.

Wiklund, L., Basu, S., Miclescu, A., Wiklund, P., Ronquist, G., & Sharma, H. S. (2007). Neuro-and cardioprotective effects of blockade of nitric oxide action by administration of methylene blue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1122*(1), 231-244.

Winefordner, J. D. (2009). *Liquid Chromatography Time of Flight Mass Spectrometry.* New Jersey: Wiley Inc Publication

Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* (pp. 753-767).

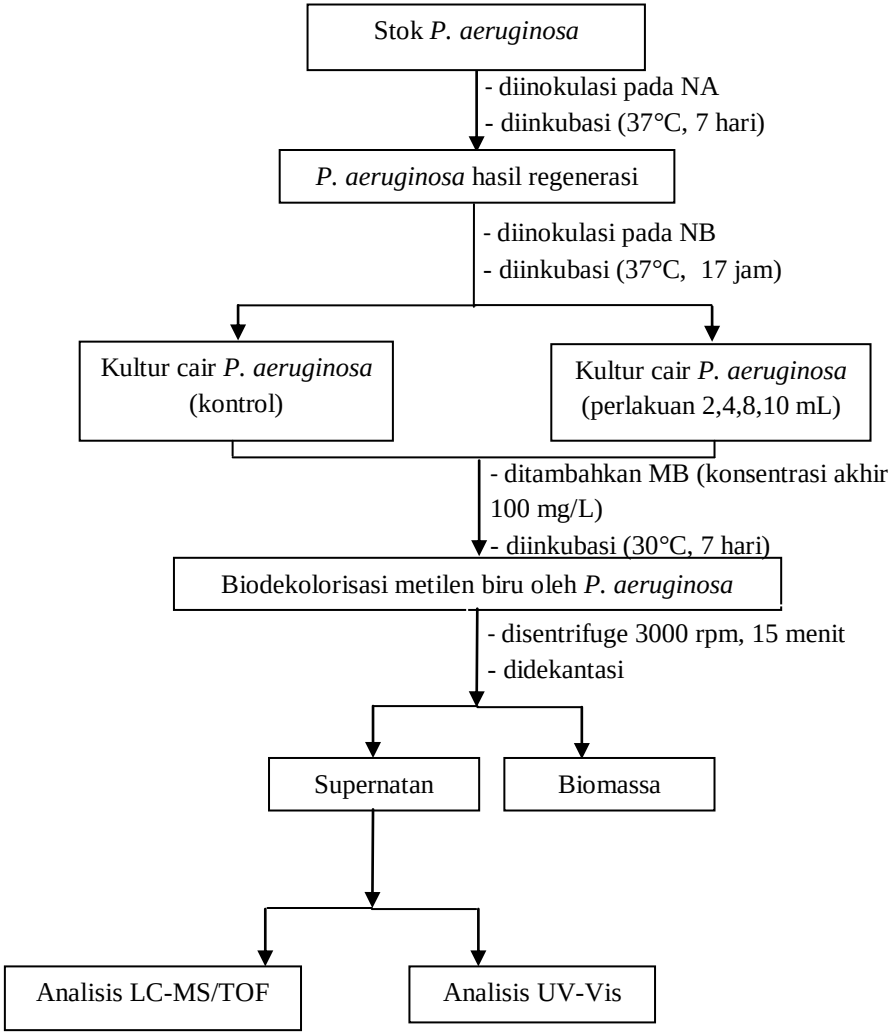
Qu, Y., Shi, S., Ma, F. & Yan, B. (2010). Decolorization of reactive dark blue K-R by the synergism of fungus and bacterium using response surface methodology, *Bioresource Technology*, 101, 21, pp. 8016–8023.

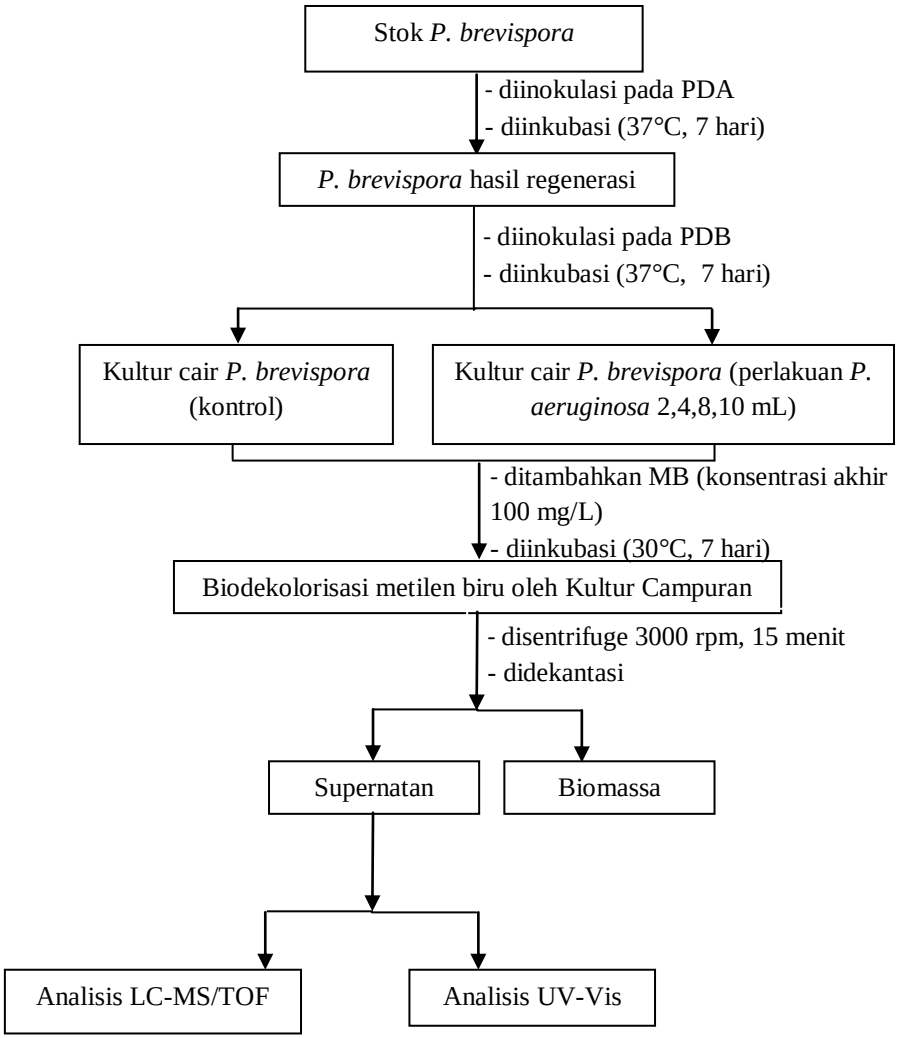
Yu, J., Wang, X., & Yue, P. L. (2001). Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *Pseudomonas* strains. *Water research*, *35*(15), 3579-3586.

Zhi, S., Tian, L., Li, N., & Zhang, K. (2018). A novel system of MnO 2-mullite-cordierite composite particle with NaClO for Methylene blue decolorization. *Journal of environmental management*, *213*, 392-399.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Lampiran 1. Diagram Alir




Stok *P. brevispora*
- diinokulasi pada PDA
- diinkubasi (37°C, 7 hari)
P. brevispora hasil regenerasi
- diinokulasi pada PDB
- diinkubasi (37°C, 7 hari)
Kultur cair *P. brevispora* (kontrol)
Kultur cair *P. brevispora* (perlakuan *P. aeruginosa* 2,4,8,10 mL)
- ditambahkan MB (konsentrasi akhir 100 mg/L)
- diinkubasi (30°C, 7 hari)
Biodekolorisasi metilen biru oleh Kultur Campuran
- disentrifuge 3000 rpm, 15 menit
- didekantasi
Supernatan
Biomassa
Analisis LC-MS/TOF
Analisis UV-Vis

Lampiran 2. Perhitungan

1. Pembuatan Larutan Metilen Biru1000 mg/L dalam 50 mL PDB

Massa PDB = $\frac{50\ mL}{1000\ mL}$ x 24 g

= 1,2 g

Massa MB = $\frac{1000\ mg}{L}$ x 50 mL

= $\frac{1000\ mg}{1000\ mL}$ x 50 mL

= 50 mg

2. Pembuatan Larutan PDB (450 mL) Sebagai Media Cair

Massa PDB = $\frac{450\ mL}{1000\ mL}$ x 24 g

=10,8 g

3. Pembuatan Larutan NB (300 mL) Sebagai Media Cair

Massa PDB = $\frac{300\ mL}{1000\ mL}$ x 8 g

= 2,4 g

4. Perhitungan % *decolorization*

Untuk menghitung persen degradasi pewarna MB sesuai persamaan:

$$\%\ decolorization = \frac{Ak - At}{Ak} \times 100\%$$

dimana :

Ak :Absorbansi kontrol (MB 100 mg/L)

At :Absorbansi padasampel

Lampiran 3. Data Analisis Sampel

Tabel 1. Data analisis Spektrofotometri UV-Vis dan % dekolorisasi oleh *P. aeruginosa*

Volume Bakteri (mL)	Absorbansi	Rata-rata absorbansi	Dekolorisasi (%)	Standar Deviasi
2	3,252	3,258	4,162	0,012
	3,263			
	3,246			
	3,273			
4	3,215	2,600	23,522	0,716
	3,226			
	1,98			
	1,98			
6	2,16	2,313	31,970	0,175
	2,163			
	2,465			
	2,464			
8	1,84	1,878	44,765	0,043
	1,842			
	1,913			
	1,917			
10	0,678	0,897	73,53	0,208
	0,676			
	0,849			
	1,118			

Tabel 2. Data analisis Spektrofotometri UV-Vis dan % dekolorisasi oleh Kultur Campuran *P. brevispora* dan *P. aeruginosa*

Volume Bakteri (mL)	Absorbansi	Rata-rata absorbansi	Dekolorisasi (%)	Standar Deviasi
2	2,297	2,384	28,170	0,093
	2,312			
	2,471			
	2,459			
4	2,257	2,03	35,309	0,143
	2,269			
	2,027			
	2,02			
6	1,967	2,016	39,277	0,061
	1,96			
	2,064			
	2,073			
8	2,097	2,104	36,649	0,015
	2,088			
	2,116			
	2,117			
10	2,085	2,187	34,119	0,115
	2,090			
	2,287			
	2,288			

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

RIWAYAT PENULIS

Penulis memiliki nama lengkap Safira Waznah Fatihah, kelahiran 1 Desember 1996 merupakan anak kedua dari dua bersaudara. Pendidikan formal yang telah ditempuh penulis yaitu MIN Malang I (2002), SMPN 5 Malang (2008), SMAN 3 Malang (2011) dan pada tahun 2014 menempuh pendidikan di Departemen Kimia Fakultas Ilmu Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Penulis mengambil bidang minat Kimia Mikrooganisme dibimbing oleh Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si., M.Si dan Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.

Selama menempuh pendidikan di ITS, penulis menjadi kru produksi dalam Unit kegiatan Mahasiswa Cinematografi ITS (CLICK) (2015), dan tergabung dalam Team Design Buku Kimia Dasar I. Penulis dapat dihubungi melalui email safira.waznah@gmail.com.