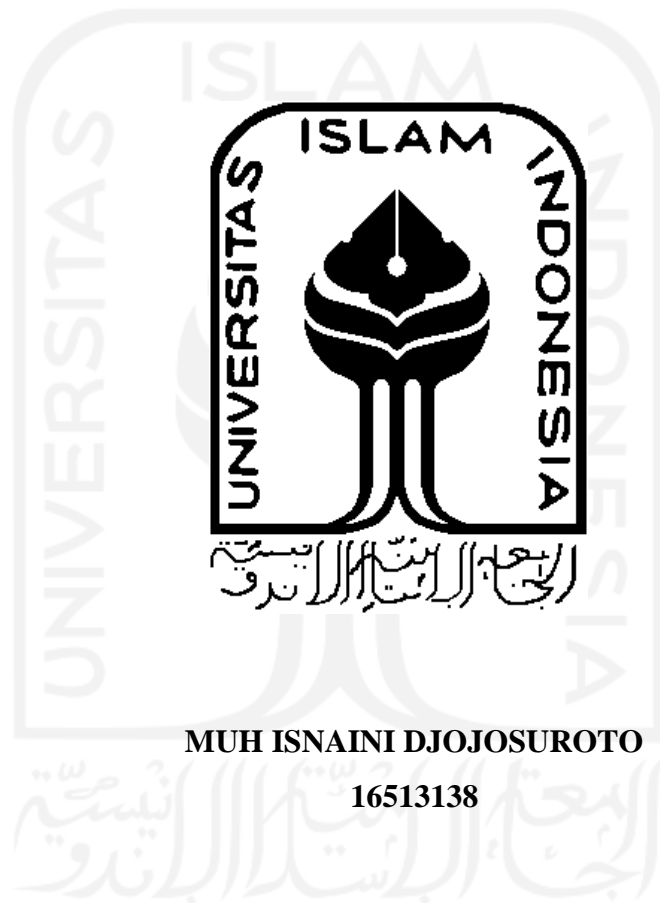


TA/TL/2021/1286

TUGAS AKHIR
ISOLASI DAN ENUMERASI BAKTERI
NITRIFIKASI (*Nitrobacter* sp.) PADA *ECOLOGICAL*
***FLOATING BED* (EFB)**

Diajukan Kepada Universitas Islam Indonesia untuk Memenuhi
Persyaratan Memperoleh Derajat Sarjana (S1) Teknik Lingkungan



MUH ISNAINI DJOJOSUROTO

16513138

PROGRAM STUDI TEKNIK LINGKUNGAN FAKULTAS
TEKNIK SIPIL DAN PERENCANAAN UNIVERSITAS ISLAM
INDONESIA
YOGYAKARTA

2021

TUGAS AKHIR
ISOLASI DAN ENUMERASI BAKTERI
NITRIFIKASI (*Nitrobacter* sp.) PADA *ECOLOGICAL*
***FLOATING BED* (EFB)**

Diajukan Kepada Universitas Islam Indonesia untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Derajat Sarjana (S1) Teknik Lingkungan



MUH ISNAINI DJOJOSUROTO

16513138

Disetujui,
Dosen Pembimbing:


Dr. Eng. Ayuluddin Nurhivanto, S.T., M. Eng

NIK: 095130403

Tanggal:


Annisa Nur Latifah, S.Si., M. Biotech, Ph.D

NIK: 155130505

Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Prodi Teknik Lingkungan FTSP UII


Eko Siswovo, S.T., M.Sc.ES., Ph.D

NIK : 025100406

Tanggal: 12 April 2021



**HALAMAN PENGESAHAN ISOLASI DAN ENUMERASI BAKTERI
NITRIFIKASI (*Nitrobacter* sp.) PADA *ECOLOGICAL FLOATING BED*
(EFB)**

Telah diterima dan disahkan oleh Tim Penguji

Hari: Senin

Tanggal: 12 April 2021

Disusun Oleh:

Muh Isnaini Djojuroto

16513138

Tim Penguji

Dr. Eng. Awaluddin Nurmiyanto, S.T., M.Eng.

Annisa Nur Latifah, S.Si., M.Biotech, Ph.D

Dr. Joni Aldilla Fajri, S.T., M.Eng.





“Halaman ini sengaja dikosongkan”

الجامعة الإسلامية
الاستدلاء بالاندية

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa:

1. Karya tulis ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik apapun, baik di Universitas Islam Indonesia maupun di perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis ini adalah merupakan gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain kecuali arahan Dosen Pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama penulis dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Program *software* computer yang digunakan dalam penelitian ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya, bukan tanggung jawab Universitas Islam Indonesia.
5. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dengan pencabutan gelar yang sudah diperoleh, serta saksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Yogyakarta, 8 April 2021

Yang membuat Pernyataan,

A 10000 Rupiah METBRA TEMARFI stamp with a signature over it. The stamp features the Garuda Pancasila logo and the text '10000', 'METBRA TEMARFI', and '3C8A2AJX048415569'.

MUH ISNAINI DJOJOSUROTO

NIM: 16513138





“Halaman ini sengaja dikosongkan”

PRAKATA

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *Subhanahu Wa Taala* atas segala berkah, rahmat, inayah dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan Tugas Akhir yang berjudul **ISOLASI DAN ENUMERASI BAKTERI NITRIFIKASI (*Nitrobacter* sp) PADA ECOLOGICAL FLOATING BED (EFB)**

Selama proses penyusunan laporan ini penulis banyak mendapatkan dukungan, bantuan, inspirasi dari banyak pihak. Maka dari itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar – besarnya dari lubuk hati yang paling dalam penulis kepada:

1. Allah *Subhanahu Wa Taala* yang telah memberikan nikmat yang tiada taranya kepada penulis.
2. Kepada orang tua penulis, Bapak Moh Arifin Djojuroto dan Ibu Safaat Bara yang telah memberikan doa, kasih sayang dan dukungan bagi penulis.
3. Kepada kakak penulis, Rizka Dayanti Djojuroto yang selalu memberikan doa dan dukungannya kepada penulis.
4. Dosen Pembimbing Tugas Akhir, Bapak Dr. Eng. Awaluddin Nurmiyanto, S.T., M.Eng. dan Ibu Annisa Nur Latifah, S.Si., M. Biotech, Ph.D yang telah membimbing penulis dengan sepenuh hati.
5. Dosen penguji Tugas akhir, Bapak Dr. Joni Aldilla Fajri, S.T., M.Eng yang telah memberikan masukan kepada penulis dengan sepenuh hati.
6. Teman – teman Tugas Akhir EFB, Taufik, Ridwan, Rozin, Fatur, dan Ilham.
7. Teman – teman Teknik Lingkungan 2016 yang telah menemani penulis selama perkuliahan berlangsung.
8. *Staff* Laboratorium Bioteknologi Lingkungan, yang telah membantu penulis selama penelitian berlangsung.
9. Pihak – pihak yang tidak dapat disebutkan satu – persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan Tugas Akhir ini masih sangat jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun

sangat penulis harapkan. Penulis berharap semoga laporan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, baik penulis maupun pembaca.

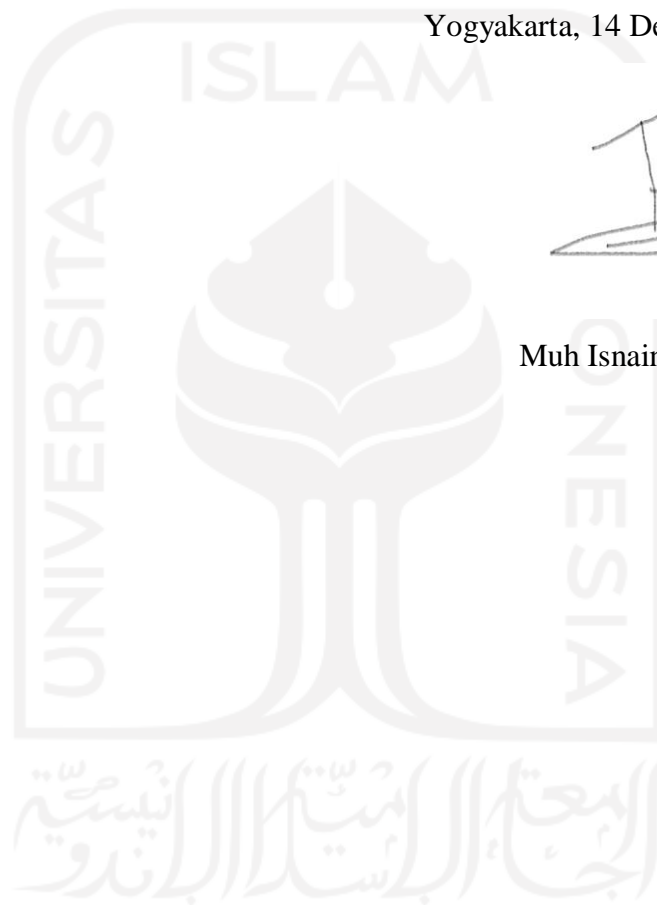
Akhir kata penulis memohon maaf yang sebesar – besarnya apabila terdapat kesalahan kata dalam penulisan.

Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Yogyakarta, 14 Desember 2020



Muh Isnaini Djojuroto



ABSTRAK

MUH ISNAINI DOJOSUROTO. Isolasi dan Enumerasi bakteri penitrifikasi (*Nitrobacter* sp.) pada *Ecological Floating Bed* (EFB). Dibimbing Oleh DR. ENG. AWALUDDIN NURMIYANTO, S.T., M.ENG dan ANNISA NUR LATIFAH, S.Si., M. Biotech, Ph.D.

Kenaikan fasilitas-fasilitas di lingkungan kampus Universitas Islam Indonesia semakin meningkat seiring berjalannya waktu. Kenaikan fasilitas tersebut menimbulkan konsekuensi yang mengakibatkan peningkatan jumlah air limbah domestik di Lingkungan, khususnya *greywater*. Teknologi *Ecological Floating Bed* termasuk teknologi alternatif pengolahan air limbah yang ramah lingkungan, ekonomis dan gampang dioperasikan. Penelitian tentang isolasi bakteri penitrifikasi (*Nitrobacter* sp.) pada *Ecological Floating Bed* (EFB) menggunakan limbah *greywater* sebagai bahan penceman dan menambahkan media penyanga spons sebagai tempat pertumbuhan mikroba. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi dan enumerasi bakteri nitrifikasi (*Nitrobacter* sp.) pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+Sponge dengan interval waktu hari ke 0, 12, 24 dan 48. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran berseri hingga 10^{-6} dengan menggunakan medium spesifik nitrifikasi (KNO_2 , K_2HPO_4 , NaCl , MgSO_4 , FeSO_4 , CaCO_3 dan CaCl_2). Isolat bakteri yang didapatkan diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Dari hasil perhitungan sampel isolat hari ke 0, 12, 24, dan 48 didapatkan nilai tertinggi bakteri *nitrobacter* sp. yaitu pada isolat hari ke 48 pada reaktor EFB+Spons berjumlah 51×10^4 CFU/ml. Hasil pengamatan morfologi sel dan pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri yang terisolasi bersifat gram negatif dan menunjukkan kemiripan morfologi dengan bakteri dari golongan *Nitrobacter*.

Kata kunci: *Ecological Floating bed*, bakteri nitrifikasi, *nitrobacter* sp.

ABSTRAK

MUH ISNAINI DJOJOSUROTO. *Isolation and Enumeration of Nitrifying Bacteria (Nitrobacter sp.) on Ecological Floating Bed (EFB). Supervised by DR. ENG. AWALUDDIN NURMIYANTO, S.T., M.ENG and ANNISA NUR LATIFAH, S.Si., M. Biotech, Ph.D.*

The increase in facilities on the campus of the Islamic University of Indonesia is increasing over time. The increase in these facilities has consequences resulting in an increase in the amount of domestic wastewater in the environment, especially greywater. Ecological Floating Bed technology, including alternative technology for waste water treatment that is environmentally friendly, economical and easy to operate. Research on the isolation of nitrifying bacteria (Nitrobacter sp.) On the Ecological Floating Bed (EFB) used Greywater waste as a dyeing agent and added sponge buffer media as a place for microbial growth. The purpose of this study was to isolate and enumerate nitrifying bacteria (Nitrobacter sp.) in the control reactor, EFB reactor and EFB + Sponge reactor with time intervals of 0, 12, 24 and 48 days. specific medium for nitrification (KNO_2 , K_2HPO_4 , $NaCl$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $CaCO_3$ and $CaCl_2$). The bacterial isolates were observed macroscopically and microscopically. From the results of the calculation of isolate samples on days 0, 12, 24, and 48, the highest value was obtained by the bacteria nitrobacter sp. namely on the 48th day isolates in the EFB + Sponge reactor amounted to 51×10^4 CFU / ml. Observation of cell morphology and gram staining showed that those isolated were gram negative and showed morphological similarities with bacteria from the Nitrobacter group.

Key words: Ecological Floating bed, nitrifying bacteria, Nitrobacter.

DAFTAR ISI

PERNYATAAN	i
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Ruang Lingkup	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Air limbah (<i>Greywater</i>)	7
2.2 <i>Ecological Floating Bed</i> (EFB).....	7
2.3 Nitrifikasi	9
2.3.1 Nitritasi	9
2.3.2 Nitritasi	10
2.4 <i>Nitrobacter</i>	11
2.5 Penelitian Terdahulu	12
BAB III METODE PENELITIAN	17
3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	17
3.2 Metode Penelitian	17
3.2.1 Pembuatan <i>Greywater</i>	17
3.2.2 Pembuatan Reaktor <i>Ecological Floating Bed</i> (EFB).....	18
3.2.3 <i>Running</i> Reaktor	19

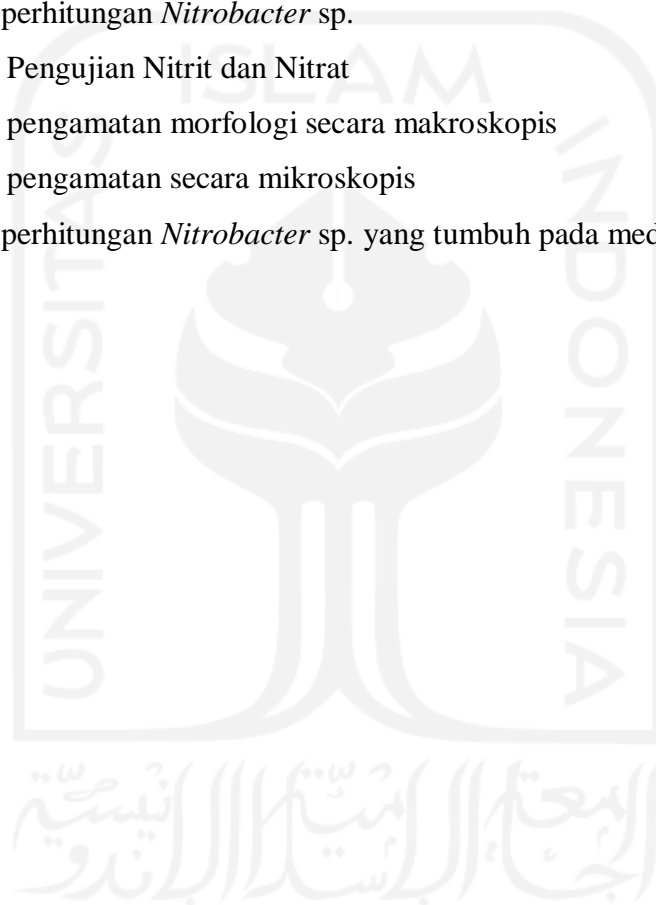
3.2.4	Pengambilan Sampel	19
3.2.5	Perhitungan total Bakteri dalam Sampel	20
3.2.6	Isolasi dan Enumerasi bakteri <i>Nitrobacter sp.</i>	20
3.2.7	Analisis Perhitungan Jumlah Total Bakteri dan Jumlah <i>Nitrobacter sp.</i>	23
	pada sampel	23
3.2.8	Identifikasi isolat <i>Nitrobacter sp.</i> dengan pewarnaan Gram	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		26
4.1	Operasional Reaktor	26
4.2	Isolasi dan Enumerasi Bakteri <i>Nitrobacter sp</i> pada reaktor EFB	28
4.3	Pengaruh bakteri <i>Nitrobacter sp</i> terhadap penurunan Nitrit dan Nitrat	38
4.4	Karakteristik Koloni Bakteri <i>Nitrobacter sp</i>	40
4.4.1	Pengamatan bakteri secara Makroskopis	40
4.4.2	Pengamatan bakteri secara Mikroskopis	43
BAB V.....		48
KESIMPULAN DAN SARAN		48
5.1	Kesimpulan	48
5.2	Saran	48
DAFTAR PUSTAKA		50
LAMPIRAN		54



“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR TABEL

1) Parameter Limbah <i>Greywater</i>	7
2) Studi Penelitian Terdahulu	12
3) Media spesifik isolasi <i>Nitrobacter</i> sp.	17
4) Reaktor, kode isolat dan lokasi pengambilan sampel	19
5) Interval waktu pengujian sampel	27
6) Data perhitungan <i>Nitrobacter</i> sp.	32
7) Hasil Pengujian Nitrit dan Nitrat	36
8) Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis	39
9) Hasil pengamatan secara mikroskopis	43
10) Data perhitungan <i>Nitrobacter</i> sp. yang tumbuh pada medium padat	47



“Halaman ini sengaja dikosongkan”



DAFTAR GAMBAR

1. Skema kerangka berfikir penelitian	3
2. Reaktor EFB	9
3. Bentuk bakteri <i>Nitrobacter</i> sp.	12
4. Tahapan menghitung jumlah koloni isolat <i>Nitrobacter</i> sp.	23
5. Tahapan pengecetan gram	24
6. Kangkung Air	25
7. Kondisi kangkung air yang mengalami kematian	26
8. Eceng gondok	26
9. Proses sterilisasi menggunakan <i>Autoclave</i>	27
10. Alat dan bahan yang telah dibungkus di sterilkan	28
11. <i>Laminar Air Flow</i> saat sterilisasi menggunakan sinar UV	28
12. Inokulasi sampel pada <i>Nutrient Broth</i>	29
13. Media cair spesifik <i>Nitrobacter</i> sp.	29
14. Tahapan pelaksanaan menggunakan LAF	30
15. Media padat spesifik inkubasi 2x24 jam	31
16. Media padat spesifik inkubasi 14 hari	31
17. padat spesifik inkubasi 30 hari	32
18. Media padat agar miring	34
19. Alat dan bahan pewarnaan gram	40
20. Preparat mikroskop dan pengujian preparat menggunakan mikroskop	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan jumlah bakteri <i>Nitrobacter</i> sp.	48
Lampiran 2 inokulasi sampel pada <i>nutrient broth</i>	51
Lampiran 3 inokulasi sampel pada media spesifik <i>Nitrobacter</i> sp.	51
Lampiran 4 Hasil isolasi bakteri hari 0 pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+S	52
Lampiran 5 Hasil isolasi bakteri hari 12 pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+S	53
Lampiran 6 Hasil isolasi bakteri hari 24 pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+S	55
Lampiran 7 Hasil isolasi bakteri hari 48 pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+S	57





“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Universitas Islam Indonesia merupakan salah satu kampus di Yogyakarta dengan kampus terpadu yang terletak di Jalan Kaliurang Km 14,5. Semakin meningkatnya kesadaran akan pendidikan membuat Universitas Islam Indonesia menjadi kampus terkemuka untuk dijadikan sumber pendidikan. Semakin pesatnya laju pertumbuhan mahasiswa, semakin bertambahnya fasilitas-fasilitas yang ada di sekitar kampus seperti *Loundry*, Kos-kosan, Rumah makan dll. Menurut Soeparman dan Soeparmin, 2002, Kenaikan fasilitas-fasilitas tersebut menimbulkan konsekuensi yang mengakibatkan peningkatan jumlah air limbah domestik di Lingkungan, khususnya *greywater*. *Greywater* merupakan air buangan yang berasal dari kegiatan mandi, berwudhu, dapur dan cuci baju. Kehadiran *Greywater* dapat menyebabkan dampak negative terhadap lingkungan dan bagi kesehatan manusia.

Greywater menyumbang hingga 70% dari limbah perumahan gabungan dan hingga 90% jika vakum toilet dipasang (Antonopoulou et al., 2013; Penn et al., 2012; Krozer et al 2010; Revitt et al., 2011). Oleh karena itu, penting untuk mengkarakterisasi kontaminan yang ada di *greywater* untuk menentukan penghilangan total diperlukan dan pilih rangkaian perawatan yang sesuai. *Greywater* yang diolah umumnya digunakan untuk keperluan yang tidak dapat diminum seperti menyiram toilet, irigasi, mobil mencuci dan berkebun karena penggunaan ini tidak membutuhkan air minum kualitas (Wu, 2019).

Greywater memiliki beberapa parameter seperti BOD, COD, pH, fosfat dan potasium. Kandungan fosfat dan potasium yang tinggi dapat menyebabkan eutrofikasi pada badan air karena memicu pertumbuhan ganggang yang pesat. Peristiwa eutrofikasi dapat menyebabkan penurunan kadar oksigen terlarut pada badan air sehingga mengakibatkan makhluk hidup di badan air tersebut tidak dapat tumbuh dengan baik atau mati (Metcalf, 1991).

Pada tanah, *greywater* dapat menurunkan unsur hara di dalam tanah, menimbulkan ketidak senangan berkehidupan karena hilangnya

estetika dan konservasi alam, dan bahaya mengancam bagi kualitas manusia maupun tumbuhan yang hidup di sekitarnya (Chatib, 1986 dalam Endita *et al.*, 2009).

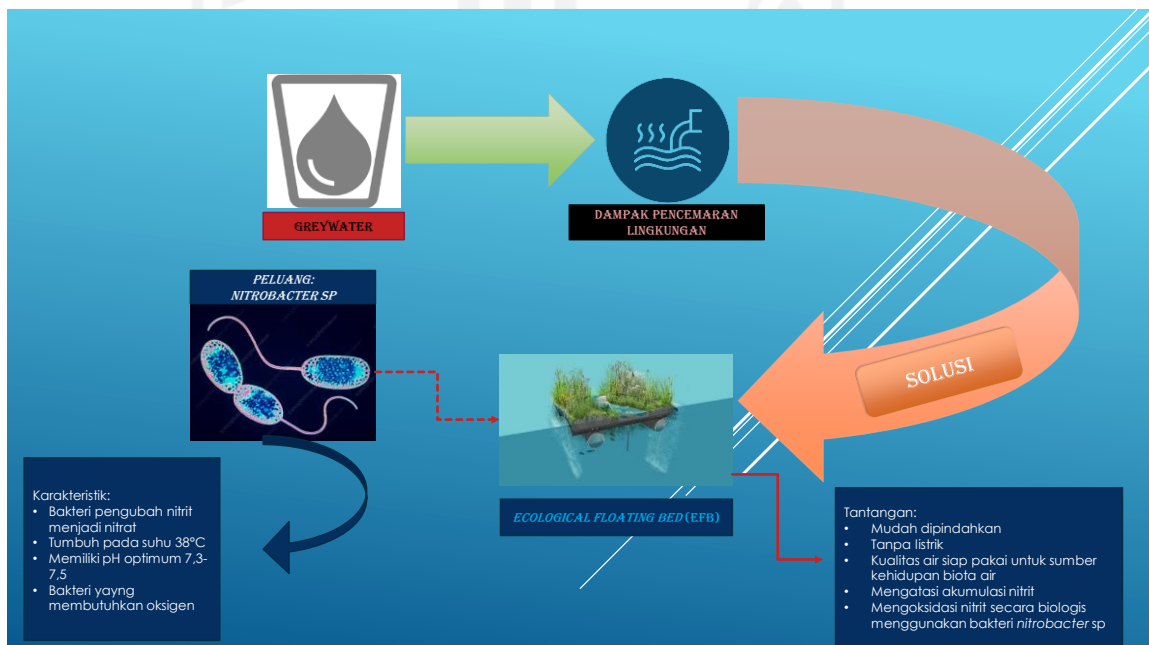
Masalah tersebut dapat dihindari dengan menggunakan *Ecological Floating Bed* (EFB) untuk pengolahan air limbah. Dengan kata lain, sangat tidak mungkin untuk mengolah air yang tercemar dengan melewati segala jenis perawatan kimiawi. Perawatan secara kimiawi juga tidak dapat menjamin karena dapat membunuh organisme air dan merusak ekosistem mereka. Sistem perawatan seharusnya hanya memurnikan air yang tercemar tanpa mengganggu kehidupan akuatik dan habitatnya. Oleh karena itu, EFB merupakan pilihan yang lebih baik untuk mendekontaminasi yang terkontaminasi badan air. EFB adalah teknologi pemulihan air dengan proses fisika, kimia, dan biologi yang efisien. secara umum teknologi EFB melakukan pemulihan air yang tercemar dengan memanfaatkan akar tanaman yang berkontak langsung dengan media tanamnya yaitu air. (Li *et al.*, 2007). Akar tanaman memiliki peran mendasar dalam struktur dan fungsi perairan ekosistem. oleh karena itu digunakan EFB untuk pemurnian air limbah, karena efisiensinya dalam mengumpulkan nitrogen dan fosfor dapat mempersiapkan kondisi yang sesuai untuk biodegradasi organik yang terperangkap oleh akar (Samal *et al.*, 2018; Di Luca *et al.*, 2011).

Ecological Floating Bed (EFB) menggunakan limbah *greywater* sebagai sumber permasalahannya. *Greywater* ini memiliki banyak unsur kimiawi. Salah satu unsur kimiawi yang terkandung di dalam *greywater* adalah nitrit (NO_2^-) dan nitrat (NO_3^-). Nitrit merupakan senyawa nitrogen yang bersifat racun apabila nitrogen mempunyai kadar tinggi. sehingga dapat menurunkan kualitas air yang merupakan sumber kehidupan bagi makhluk hidup, khususnya biota air. salah satu metode yang digunakan untuk mengatasi akumulasi nitrit yang terkandung di dalam limbah yaitu proses nitrifikasi secara biologi. Proses nitrifikasi dilakukan dengan menggunakan aktivitas bakteri-bakteri pengoksidasi nitrit atau disebut

juga bakteri denitrifikasi. Bakteri penitrifikasi yang umum digunakan adalah bakteri denitrifikasi yang berasal dari Genus *Nitrobacter* sp.

Secara morfologi *Nitrobacter* sp. tumbuh dengan baik pada suhu sekitar 30° C serta pH 5.8-8.5 selnya berbentuk batang pendek, pleomorfik, seringkali berbentuk pears, Gram negatif, dan biasanya non motil. *Nitrobacter* sp. diketahui mampu mengoksidasi nitrit menjadi nitrat. Habitat genus bakteri ini tersebar pada tanah, air tawar, dan air laut (Holt et al., 1994).

Penghilangan nitrit secara biologis melalui proses nitrifikasi merupakan salah satu metode yang dapat dianggap ekonomis dan efisien. Melihat hal tersebut maka dibutuhkan sumber-sumber isolat bakteri penitrifikasi, khususnya *Nitrobacter* sp. untuk menanggulangi masalah akumulasi nitrit di kawasan perairan ini (Paungfoo et al., 2006). Salah satu sumber isolat bakteri penitrifikasi adalah air limbah pada EFB. Air limbah diduga memiliki kandungan nitrat yang tinggi karena merupakan salah satu komponen yang terkandung di dalam EFB. Adanya kandungan nitrat dan bahan organik dalam air merupakan habitat yang baik bagi bakteri penitrifikasi.



Gambar. 1 Skema kerangka berfikir penelitian

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang yang terdapat di atas maka terdapat masalah, yaitu limbah *greywater* pada EFB hidup bakteri *Nitrobacter* sp. oleh sebab itu disusun rumusan masalah, yaitu:

1. Bagaimana prosedur isolasi bakteri *Nitrobacter* sp. dari sampel reaktor Kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+Spons?
2. Bagaimana distribusi dan kepadatan bakteri *Nitrobacter* sp. pada reaktor Kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB + Spons?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang ingin di capai dari pelaksanaan penelitian ini yaitu :

1. Melakukan isolasi bakteri *Nitrobacter* sp. dari sampel reaktor Kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+Spons?
2. Mengidentifikasi distribusi dan kepadatan bakteri *Nitrobacter* sp. pada reaktor Kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB + Spons?

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang didapat dari penelitian ini baik bagi perguruan tinggi, masyarakat dan pemerintah, yaitu:

1. Bagi Perguruan Tinggi
Memberikan refrensi opsi teknologi pengolahan limbah *greywater* dalam meningkatkan konsentrasi nitrat.
2. Bagi Masyarakat .
Memberikan solusi bagi masyarakat sekitar kampus Universitas Islam Indonesia dalam pengolahan limbah *greywater*.

1.5 Ruang Lingkup

Batasan masalah dalam penelitian meliputi :

1. Penelitian berlokasi di Laboratorium Kualitas Lingkungan Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Universitas Islam Indonesia (FTSP UII) Gedung M. Natsir, Jalan Kaliurang KM 14,5, Sleman, Yogyakarta.
2. Limbah *greywater* yang digunakan berasal dari sampel reaktor Kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+Spons kampus Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Universitas Islam Indonesia (FTSP UII) Gedung M. Natsir, Jalan Kaliurang KM 14,5, Sleman, Yogyakarta.
3. Parameter yang akan di uji adalah :
 - a. Parameter khusus adalah *Nitrobacter* sp.
 - b. Parameter umum adalah pH dan suhu.





“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Air limbah (*Greywater*)

Greywater adalah air buangan yang berasal dari fasilitas daerah komersial, perumahan, tempat ibadah, institusi dan fasilitas sejenis (Metcalf dan Eddy, 1991). Grey water adalah limbah cair domestik yang terpisah dengan limbah dari toilet dan kakus (black water). Grey water berasal dari bekas air mandi dari bath up, shower atau bak mandi, air bekas mencuci pakaian baik dari mesin cuci atau ember-ember cucian, dan air bekas aktifitas dapur rumah tangga, gedung-gedung perkantoran maupun sekolah (Erickson dkk, 2002).

Karakteristik limbah *greywater* mengandung sabun, minyak lemak, deterjen dan mikroorganisme. *Greywater* memiliki nilai pH berkisar pada 5 – 10. Nilai pH *greywater* dipengaruhi oleh kebasaaan air dan produk kimia yang digunakan. Konsentrasi chemical oxygen demand (COD) berkisar pada (13 – 8000) mg/L, (BOD) berkisar (5 –1460) mg/L (Eriksson, E.,*et al*, 2002).

Berikut parameter limbah *greywater* secara umum adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Parameter Limbah Greywater

Parameter	satuan	kadar
pH	=	6 s\d 10
BOD	mg/l	100
TSS	mg/l	100
Minyak dan Lemak	mg/l	10

Sumber: Kepmen LH No. 112 thn 2003

Kehadiran limbah *greywater* dapat berdampak negatif terhadap lingkungan dan kesehatan manusia, sehingga perlu dilakukan pengolahan terhadap limbah. Tingkat bahaya keracunan yang ditimbulkan oleh limbah tergantung pada jenis dan karakteristik limbah (Soeparman dan Soeparmin, 2002).

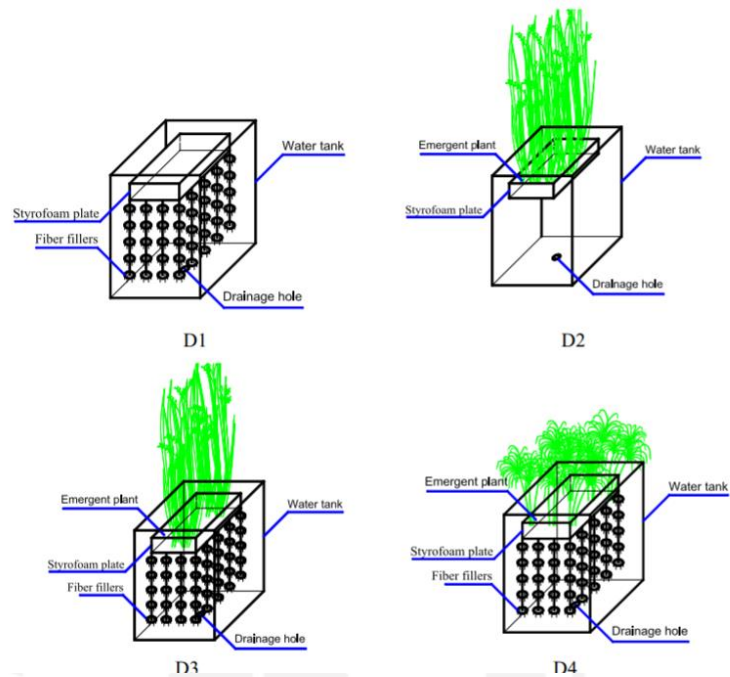
2.2 *Ecological Floating Bed (EFB)*

Ecological floating bed (EFB) memiliki keunggulan unik yaitu tidak membutuhkan lahan yang besar jika dibandingkan dengan lahan basah

konvensional yang dibangun berbasis makrofit di hidrofit ekosistem (Huang et al., 2013; Iamchaturapatr et al., 2007; Li dkk., 2010; Sun et al., 2009;). EFB menggunakan media mikroba yang secara efektif dapat menguraikan atau memberi mineralisasi bahan organik dan mendapatkan energi. Pada saat yang sama, mikroba juga dapat menyediakan makanan bagi hewan air dan memberikan nutrisi atau zat. Mikroba adalah bagian penting dari rantai makanan ekosistem air. Penyerapan tanaman dan hasil dekomposisi mikroba dalam air memberikan permunian secara alami.

Ecological floating bed (EFB) adalah jenis reaktor penguatan restorasi ekologis, yang terdiri dari media pembawa mikroba dan tanaman air. Reaktor EFB menggunakan tumbuhan air dan mikroba sebagai pelengkap fungsi restorasi ekologis. Pada EFB biomassa yang lebih besar dapat diperkaya di dalam ruang terbatas reaktor untuk mencapai perawatan yang cepat dan efisien. Tumbuhan dan mikroorganisme merupakan faktor ekologi penting dari EFB, karena tanaman dapat menyerap Nitrogen (N), Fosfor (P) dan garam anorganik dalam air. Fungsi dari tumbuhan dan mikroorganisme juga dapat menghilangkan nitrogen dan fosfor dari lingkungan akuatik. Pada saat yang sama, akar dari tumbuhan bisa menarik mikroorganisme, memperkaya mikroba, meningkatkan biomassa dan untuk pertumbuhan mikroorganisme aerobik sehingga dapat menyelesaikan fungsi degradasi.

Berikut ini adalah gambar reaktor dari EFB



Gambar.2 Reaktor EFB (Sumber; Q. Wu *et al.* / *Bioresource Technology* 211 (2016) 451–456)

Gambar reaktor EFB di atas menjelaskan bahwa D1 hanya memiliki pengisi serat di dalamnya, D2 hanya memiliki alas terapung biologis (*Iris pseudacorus* L), D3 adalah *Iris pseudacorus* L dilengkapi dengan perangkat jaringan biologis, dan D4 adalah perangkat jaringan biologis (*Canna indica* L).

2.3 Nitrifikasi

Proses nitrifikasi menurut Grady & Lim (1980) adalah konvensi nitrogen ammonium (NH_4^+N) menjadi nitrit (NO_2^-N) menjadi nitrat (NO_3^-N) melalui peran bakteri autoropik dan hetetropik. Nitrifikasi melalui dua tahap proses yaitu nitritasi dan nitrasi.

2.3.1 Nitritasi

Nitritasi merupakan tahap oksidasi ion ammonium (NH_4^+N) menjadi ion nitrit (NO_2^-N) yang dilakukan bakteri *Nitrosomonas* sp. melalui reaksi berikut:

Nitrosomonas



Reaksi di atas membutuhkan 3,43 gr O₂ untuk mengoksidasi 1 gr N menjadi nitrit.

2.3.2 Nitrasi

Tahap nitrasi merupakan tahap oksidasi ion nitrit menjadi ion nitrat (NO₃) yang dilakukan oleh bakteri *nitrobacter* melalui reaksi berikut:



Reaksi di atas membutuhkan 1,14 gr O₂ untuk mengoksidasi 1 gr nitrogen menjadi nitrat.

Secara keseluruhan, berikut proses nitrifikasi sengan persamaannya:



Reaksi di atas adalah reaksi yang menghasilkan energi (eksotermik). Jika bakteri *nitrosomonas* dan *nitrobacter* ada di perairan, maka konsentrasi nitrit dalam air akan berkurang karena *nitrosomonas* yang membentuk nitrit dan dioksidasi oleh *nitrobacter* untuk membentuk nitrat.

Kedua bakteri tersebut yaitu bakteri yang dapat mensuplai karbon dan nitrogen dengan sendirinya. Bakteri ini memakai energi dari proses nitrifikasi untuk dapat membentuk sel sintesa yang baru (Vrestraete, 1972).

Menurut Alexander (1999), *Nitrosomonas* dan *nitrobacter* tergolong ke dalam bakteri kemoautotrof obligat. Kemoautotrof obligat memerlukan sumber energi yang spesifik, misalnya, *Nitrosomonas* membutuhkan amonium sebagai sumber energi dan *nitrobacter* memerlukan nitrit. Akan tetapi, *Nitrobacter* dapat menggunakan asetat sebagai sumber karbon dan energi, sehingga sebenarnya istilah 'autotrof fakultatif' mungkin lebih sesuai (Imas *et al.*, 1989).

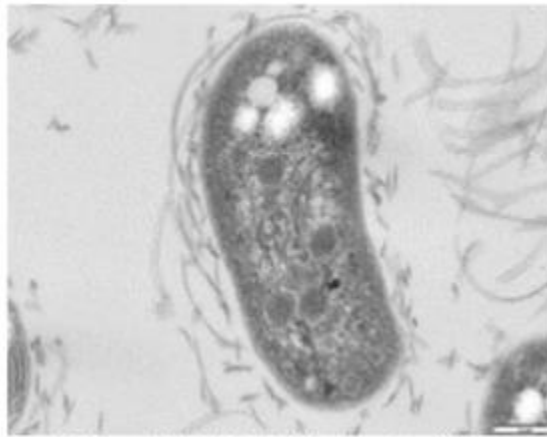
2.4 *Nitrobacter*

Nitrobacter merupakan bakteri nitrifikasi yang mengubah nitrit menjadi nitrat. *Nitrobacter* termasuk famili *Nitrobacteraceae*. Spesies *nitrobacter* meliputi *Nitrobacter alkalicus*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgaris*, *Nitrobacter winogradskyi*, dan *Nitrobacter alkalicus*. Selain itu, *nitrobacter* merupakan subkelas dari *Proteobacteria*. untuk membentuk fiksasi karbon, *Nitrobakter* memakai energi dari oksidasi ion nitrit (NO_2^-) menjadi ion nitrat (NO_3^-) untuk memenuhi kebutuhan karbonnya.

Selain *Nitrobacter* sp, bakteri lain yang mampu mengoksidasi nitrit adalah genus Nitrococcus (*Nitrococcus mobilis* merupakan spesies yang termasuk Nitrococcus, bakteri ini hanya berkembang di perairan laut), genus Nitrospina (*Nitrospina gracilis*), dan Nitrospira (Magdalena, 2009).

Nitrobakter merupakan bakteri nitrifikasi yang mengubah nitrit menjadi nitrat. Nitrobakter tumbuh pada suhu 38°C dan memiliki pH optimum antara 7,3-7,5. *Nitrobacter* termasuk ke dalam bakteri yang membutuhkan oksigen (aerob), dengan ciri-ciri berbentuk batang, seperti pleomorfhic atau pir dan berkembang biak dengan tunas. (Grundman *et al.* 2000).

Karakteristik *nitrobacter* yaitu mereka memerlukan oksigen dan makanan sebagai kebutuhan hidup serta membangun koloni pada media yang memiliki permukaan keras dan bersih. *Nitrobacter* termasuk lama dalam replikasi, berbeda dengan bakteri lain yang mereplikasi dengan cepat. Pada air tawar, *nitrobacter* membutuhkan waktu 8 jam untuk bereplika, sedangkan pada air laut *nitrobacter* membutuhkan waktu sekitar 24 jam, dibandingkan bakteri *nitrobacte* yang ada pada air tawar (Grundman *et al.* 200, Holt, 1993)



Gambar 3. Bentuk Bakteri *Nitrobacter sp.* Sumber: (Krisno, 2011)

2.5 Penelitian Terdahulu

Penelitian terdahulu adalah bagian dari referensi untuk memudahkan penulis dalam melakukan penelitian, sehingga penulis dapat lebih mudah dalam menentukan langkah-langkah yang lebih sistematis dari segi konsep maupun materi. Berikut merupakan penelitian terdahulu berupa beberapa jurnal terkait dengan penelitian yang dilakukan penulis.

Tabel 2. Studi Penelitian Terdahulu

No	Sumber	Topik	Metode	Hasil
1	Nusa idaman dan Muhamm ad Rizki, 2014	Penghilang amoniak di dalam air limbah domestic dengan prosesmoving bed biofilm reaktor (mbbr)	Percobaan dilakukan menggunakan reaktor MBBR dari proses lumpur aktif dengan menambahkan media plastic bio ball ke dalam aerasi sebagai rumah bakteri nitrifikasi,	Dari penelitian yang dilakukan, menun jukkan bahwa dengan waktu tinggal hifrolik dalam tangka aerasi 12 jam, 8 jam, 6 jam dan 4 jam, efesiensi penghilang amoniak masing-

			memilik permukaan spesifik 210m ² /m ³ sebanyak 20% dari volume tangka aerasi.	masing adalah 94,05%, 89% dan 79,6% dengan beban amoniak sebesar 0,106-0,302 kg/m ² .hari.
2	Yuli Ratna Pratiwi, 2011.	Isolasi dan seleksi bakteri penitrifikasi dari sampel tanah di sekitar kandang ternak di kabupaten Bogor.	Isolasi dan seleksi bakteri penitrifikasi dengan menggunakan metode <i>encriment culture</i> dengan media spesifik untuk masing-masing bakteri. Dengan tiga taraf konsentrasi (NH ₄) ₂ SO ₄ , yaitu 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm (NH ₄) ₂ SO ₄ . Penetapan konsentrasi amonium dan nitrat dilakukan dengan	Dari hasil penelitian Aktivitas bakteri penitrifikasi paling optimum terjadi pada media spesifik dengan taraf konsentrasi 500 ppm (NH ₄) ₂ SO ₄ dan pada hari ke-4 setelah inkubasi. Isolat "Nitrosomonas" yang mampu menurunkan konsentrasi amonium dengan cepat pada konsentrasi tersebut secara berurutan dari

			<p>menggunakan Spectrophotometer.</p>	<p>yang paling cepat adalah isolat NSp1, NSkm1, NSkm2, NSkm3, dan NSp3, sedangkan isolat "Nitrobacter" yang paling cepat meningkatkan konsentrasi nitrat secara berurutan dari yang paling cepat adalah NBsp1, NBkb1, NBam, NBsp5, dan NBkm4. Isolatisolat tersebut kemudian dipasangkan sehingga diperoleh 25 pasang isolat yang juga ditetapkan kemampuannya dalam menurunkan konsentrasi amonium sekaligus meningkatkan</p>
--	--	--	---------------------------------------	--

				konsentrasi nitrat.
3	Rezky, 2015	Distibusi bakteri nitrifikasi (<i>nitrosomonas</i> dan <i>nitrobacter</i>)	Penelitian ini melakukan pengambilan sampel air di sungai dan laut dengan memasukkan botol sampel 250 ml dengan kemiringan 45°C pada kedalaman 10 cm. inokulasi bakteri dilakukan dengan beberapa tahap. Tahap pertama yaitu dengan pengayaan bakteri, sebanyak 10 ml sampel air diinokulasi ke dalam 90 ml medium selektif <i>nitrosomonas</i> dan <i>nitrobacter</i> dan	Hasil yang didapatkan bakteri nitrifikasi terdapat pada semua lokasi penelitian kepadatan bakteri <i>Nitrosomonas</i> ST I (Sungai) yaitu 11,07 CFU/ml, ST II (Muara Sungai) yaitu 11,93 CFU/ml dan ST III (Laut) yaitu 8,97 CFU/ml, kepadatan bakteri <i>Nitrobacter</i> pada ST I (Sungai) yaitu 23,90 CFU/ml, ST II (Muara Sungai)

			<p>dikocok menggunakan shaker selama 10 hari. Kemudian media selektif diambil 1 ml untuk dilakukan pengenceran hingga 10^{-6} dengan larutan NaCl. masing-masing pengenceran diambil 1 ml dan dimasukkan dalam cawan petri steril kemudian ditambahkan 20 ml medium nitrifikasi lalu di homogenkan, setelah memadat diinkubasi suhu 35°C selama 3-5 hari. Perhitungan jumlah koloni bakteri dengan berdasarkan perhitungan Standar Plate Count (hitungan cawan).</p>	<p>yaitu 26,50 CFU/ml dan ST III (Laut) yaitu 21,80 CFU/ml.</p>
--	--	--	--	---

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama 2 bulan terhitung dari September 2020 sampai dengan Desember 2020. Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Biotech, Program Studi Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

3.2 Metode Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu, *laminar flow*, *spectrophotometer*, oven, timbangan, *autoclave*, pipet, Erlenmeyer, gelas piala, timbangan analitik, cawan petri, micro pinset, glass beaker 100 ml, botol sampel, shaker, hot plate, vortex, waterbath dan lampu bunsen.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, sampel air yang ada pada reaktor Kontrol, *Ecological floating bed* (EFB) dan *Ecological floating bed* (EFB) + spons, media spesifik *Nitrobacter* sp. (Tabel 3), larutan Buffer sitrat, Na-Fenolat, dan NaCl 5%, bahan yang digunakan untuk mengukur konsentrasi nitrat yaitu H₂SO₄ pekat, Brusin, medium selektif *Nitrosomonas* dan *Nitrobacter*, NaCl, HgCl₂, aquades steril, spirtus, aluminium foil, tissue, kapas, kertas label, sarung tangan karet dan masker.

Tabel 3. Media spesifik isolasi *Nitrobacter* sp. (Verstraete, 1981 dalam Iswandi, 1989)

Komposisi	Jumlah (per liter media)
KNO ₂	0.006 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaCl	0.3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.03 g
CaCO ₃	1.0 g
CaCl ₂	0.3 g

3.2.1 Pembuatan Greywater

Pada penelitian ini, awalnya air limbah yang akan digunakan yaitu air limbah yang ada di sekitaran kampus Universitas Islam Indonesia (UII),

akan tetapi pada saat melakukan pengambilan sampel tidak memungkinkan dikareakan cuaca kemarau sehingga menyebabkan air sungai mengalami kekeringan. Sehingga pada penelitian ini menggunakan air limbah buatan yang menyerupai air limbah *greywater* pada umumnya. Pemuatan air limbah menggunakan air keran 100 liter yang kemudian ditambahkan komposisi-komposisi *greywater*. Komposisi-komposisi air limbah buatan dapat dilihat pada tabel. 3.

Tabel. 3 Komposisi air limbah

No	Larutan	Komposisi	Jumlah	Satuan	Konsentrasi
1	Larutan Induk Nitrat	0,722 gr KNO ₃ + 2 mL CHCl ₃ + 1000 mL Aquades	1	Liter	100 mg/L
2	Larutan Induk Nitrit	1,232 gr NaNO ₂ + 1000 ml Aquades	1	Liter	250 mg/L
3	Larutan Induk Amonia	3,819 gr NH ₄ Cl + 1000 mL Aquades	250	ml	1000 mg/L
4	Larutan Induk Pospat	2,195 gr KH ₂ PO ₄ + 1000 mL Aquades	100	ml	500 mg/L
5	Air Gula 0,1 M	-	1	Liter	-
6	Detergen	-	10	gram	-
7	Pupuk NPK	-	200	ml	-

Proses-proses pembuatan air limbah menggunakan bahan-bahan yang ada di dalam laboratorium dan bahan-bahan yang ada di kehidupan sehari-hari. Bahan-bahan yang ada di laboratorium merupakan bahan seperti nitrit, nitrat dan amoniak. Sedangkan bahan-bahan yang ada di kehidupan sehari-hari merupakan bahan seperti pupuk cair, detergen dan gula.

3.2.2 Pembuatan Reaktor *Ecological Floating Bed* (EFB)

Pada penelitian ini, reaktor yang digunakan yaitu aquarium kaca dengan ukuran volume 100cm X 40cm X 40cm. selanjutnya aquarium tersebut di isi dengan air *greywater* sebanyak 100 liter. Setelah itu, ditambahkan rakitan pipa 0,5 inci dan elbow 0,5 inci sampai berbentuk persegi dengan dipasangkan jaring pada tengah pipa tersebut sebagai wadah pot dan sebagai penutup untuk mengurangi masuknya bahan-bahan yang tidak dibutuhkan. Penggunaan pot sebagai wadah untuk penanaman eceng gondok (*Eichhornia crassipes*). Reaktor yang dibuat berjumlah tiga buah yang bertujuan, reaktor pertama sebagai reaktor kontrol hanya di isi dengan air limbah, reaktor kedua Ecological Floating Bed menggunakan

spons dengan jenis bioball yang ditujukan sebagai media tumbuh mikroorganisme yang hidup di reaktor, dan yang terakhir adalah reaktor Ecological Floating Bed tanpa spons sebagai bahan komparasi dengan reaktor menggunakan spons.

3.2.3 *Running Reaktor*

Tahapan pertama yang dilakukan sebelum menjalankan reaktor adalah aklimatisasi tanaman eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) selama 6 hari dengan pengecekan setiap 2 hari sekali, aklimatisasi adalah suatu tahapan penyesuaian diri tanaman hasil kultur jaringan terhadap lingkungan sekitar. Aklimatisasi dapat disebut sebagai tahapan penyesuaian diri, sebelum pada akhirnya tanaman mampu hidup di lingkungan yang baru (Kusuma 2009).

3.2.4 *Pengambilan Sampel*

Sampel air limbah diambil pada 3 titik di reaktor *control*, *Ecological floating bed* (EFB) dan *Ecological floating bed* (EFB)+spons (Tabel 4). Pengambilan sampel air dilakukan secara komposit berdasarkan SNI 6989.59:2008 tentang Metoda pengambilan air limbah dengan kedalaman 20 cm. Selanjutnya dilakukan isolasi bakteri *nitrobacter* menggunakan media khusus. Masing-masing sampel air diberi kode isolat yang diawali huruf NB (Tabel 4). Sampling dilakukan sebanyak 3 kali, pada hari ke 12, hari ke 24 dan hari ke 48.

Tabel.4 Reaktor, Kode sampel dan Lokasi pengambilan sampe sebagai sumber isolat

Reaktor	Kode Isolat	Lokasi Pengambilan Sampel
Kontrol	NB0	Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Universitas Islam Indonesia
EFB	NB1	Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Universitas Islam Indonesia
EFB+Spons	NB2	

3.2.5 Perhitungan total Bakteri dalam Sampel

Masing-masing sampel dihitung total kandungan bakterinya dengan metode *Direct Plating*. Sebanyak 1 ml sampel diencerkan dengan akuades steril sampai pada pengenceran 10^{-8} . Pada pengenceran $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan pada media Nutrient Agar dalam cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dihitung menggunakan *colony counter*.

Perhitungan jumlah koloni bakteri dilakukan pada cawan yang mengandung 25 hingga 300 koloni bakteri sesuai dengan SNI 01- 2332.3-2006 tentang pengujian angka lempeng total. Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri kemudian dimasukkan ke dalam rumus:

$$N = \text{jumlah koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

Dengan:

Faktor pengenceran = pengenceran x jumlah yang ditumbuhkan

N = jumlah koloni produk (koloni per ml atau per gram)

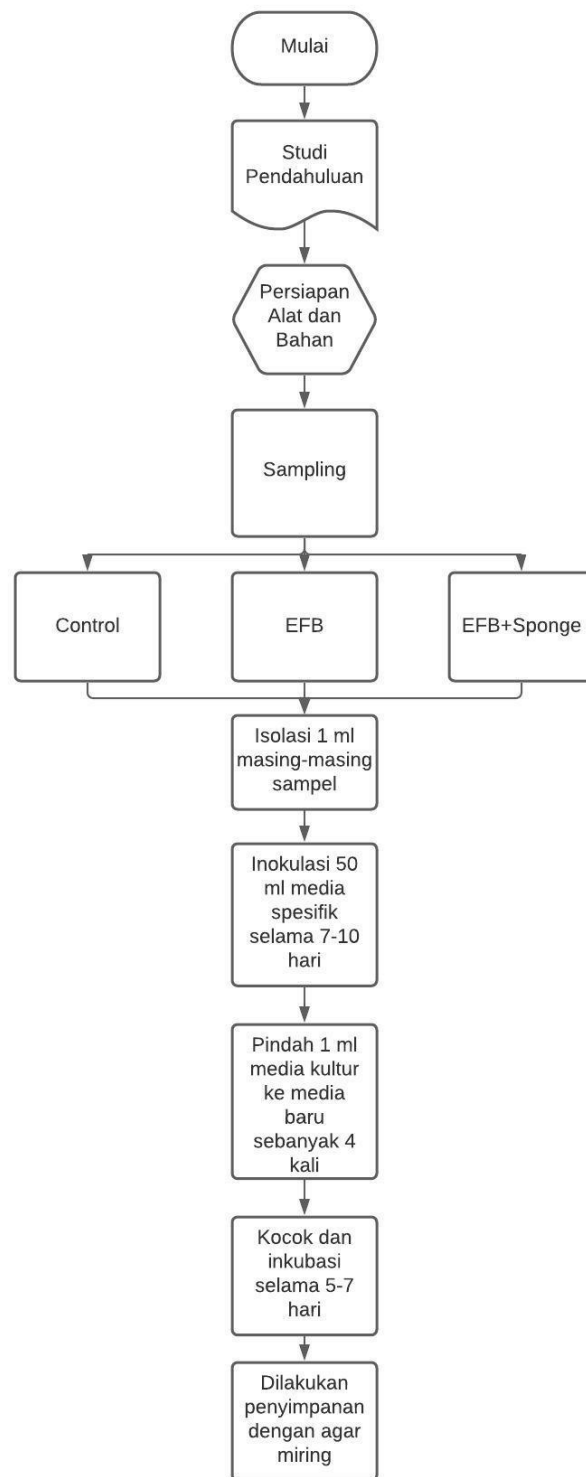
Keterangan = Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 250 pada seluruh pengenceran, maka melaporkan hasilnya sebagai terlalu banyak dihitung (TBUD)

3.2.6 Isolasi dan Enumerasi bakteri *Nitrobacter sp.*

Proses isolasi bakteri *Nitrobacter* dilakukan dengan menggunakan metode *Direct plating* pada media spesifik. sebanyak 5 ml sampel air yang telah diperoleh, dimasukkan ke dalam 45 ml media *bacto agar* dan dikocok menggunakan shaker selama 7-10 hari sampai warna media mengkeruh. Selanjutnya sampel inokulasi, diambil sebanyak 5 ml dan diinokulasikan ke dalam masing-masing 45 ml media spesifik *Nitrobacter sp.* (Tabel 1). Media

spesifik tersebut berupa media cair. Kultur cair berisi isolat tersebut dikocok dengan menggunakan shaker dan diinkubasi selama 7-10 hari. adanya bakteri penghasil nitrat dindikasikan dengan perubahan warna media dari bening menjadi keruh (kultur positif). Kultur cair tersebut selanjutnya dilakukan pengenceran (*serial dilution*) sampai pada pengenceran 10^{-6} . Sampel pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} selanjutnya di plating pada mwdi bacto agar dan media spesifik *Nitrobacter* padat dalam cawan petri kemudian disimpan di inkubator pada suhu 30°C . koloni yang tumbuh kemudian dihitung menggunakan *colony counter*. Koloni yang menunjukkan morfologi koloni yang sama diambil satu dan diinokulasikan pada media agar miring untuk dijadikan stock koloni dan akan digunakan untuk pengujian selanjutnya.





Gambar. 4 Tahapan isolasi dan enumerasi

3.2.7 Analisis Perhitungan Jumlah Total Bakteri dan Jumlah *Nitrobacter* sp. pada sampel

Perhitungan jumlah total bakteri dan *Nitrobacter* dihitung dengan metode *Total Plate Agar* (TPC). Prinsip dari metode ini yaitu, mikroorganisme yang masih hidup pada medium agar akan berkembang biak dan membentuk koloni yang bisa dilihat langsung (Nirliani, 2007).

Jumlah mikroba yang berkembang biak pada cawan berkisar antara 30-300 koloni cfu/g. apabila jumlah mikroba tiap sampel lebih dari 300 efu/ml sampel bisa dikategorikan turbidimetri (Sukmawati, 2018).

Untuk menghitung nilai TPC (*total plate caount*) (cfu/ml) pada 3 sampel dengan melakukan pengenceran. Masing-masing sampel diambil 1 ml diencerkan secara bertingkat dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-6} dengan aquades dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Perbandingan antara air sampel dan aquades dalam pengenceran yaitu 1:9 yang berarti 1 ml sampel air dan 9 ml aquades. Menurut Wasteson dan Hornes (2009) dalam Yunita *et al* (2019). (2015), tujuan dari pengenceran bertingkat adalah mengurangi mikroba dalam cairan dengan melakukan pengenceran 1:9 sehingga didapat 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran. Selanjutnya, pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} diplating ke dalam media *plate count agar* (PCA) yakni dengan cara menuangkan 1 ml sampel ke dalam cawan petri steril dengan mikropipet kemudian menuangkan media PCA cair. cawan petri yang sudah dimasukkan media dan sampel kemudian diputar dalam bentuk angka delapan, setelah mengeras, cawan petri di bungkus dengan kertas buram kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam (Yunita *et al*, 2015)

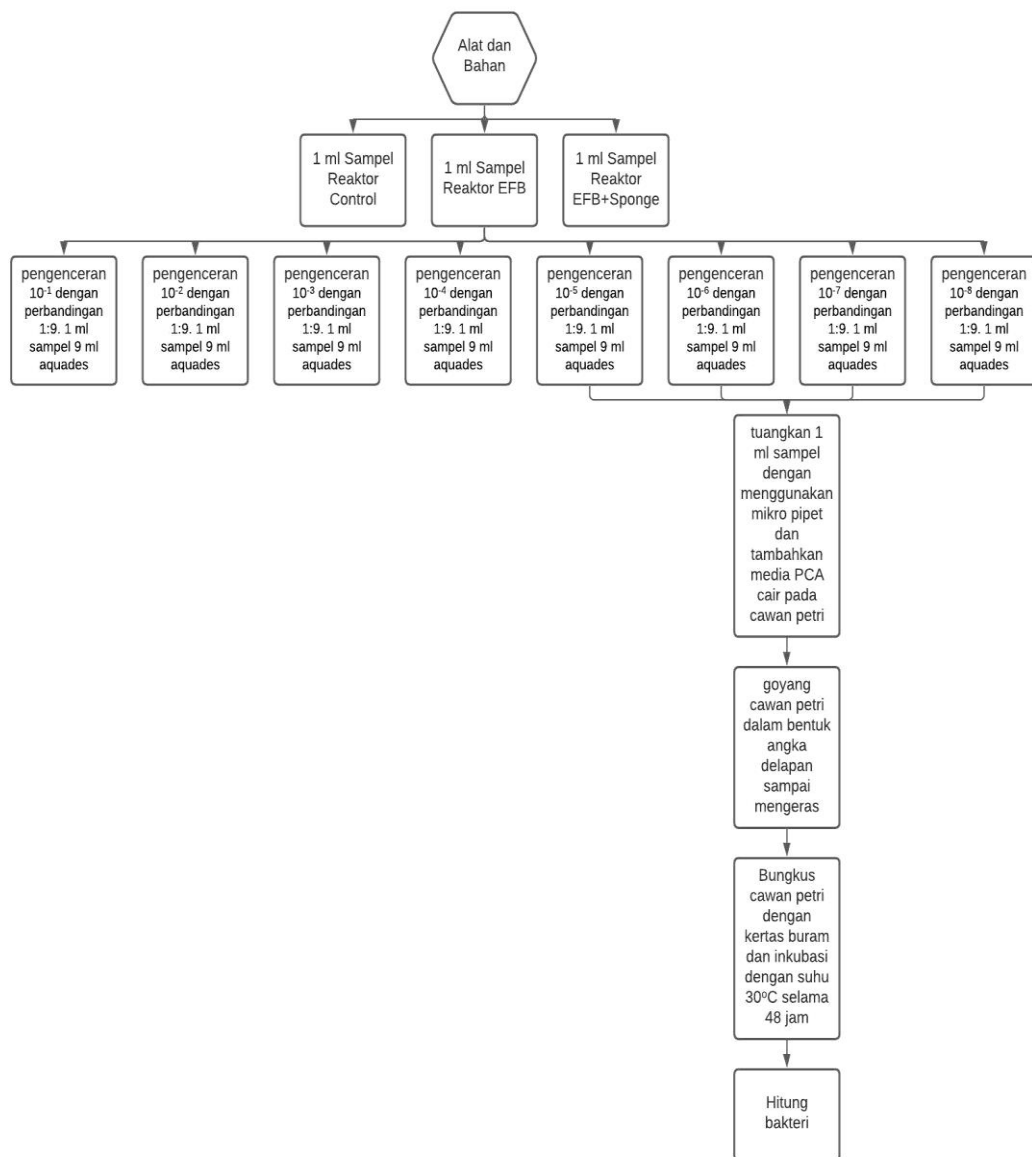
Menurut Hartanti, 2013 bahwa perhitungan jumlah koloni bakteri dilakukan pada cawan yang mengandung 25 hingga 300 koloni bakteri sesuai dengan SNI 01- 2332.3-2006 tentang pengujian angka lempeng total. Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri kemudian dimasukkan ke dalam rumus:

Cara Perhitungan: Jumlah sel relatif = $V \times n \times 1/f$ (CFU/mL)

V = jumlah sampel yang ditumbuhkan

n = jumlah koloni dalam cawan

f = faktor pengenceran



Gambar. 5 tahapan menghitung jumlah koloni bakteri *Nitrobacter* sp.

3.2.8 Identifikasi isolat *Nitrobacter* sp. dengan pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram atau metode Gram adalah suatu metode empiris untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yakni gram positif dan gram negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel mereka.

Tahapan pewarnaan Gram diawali dengan membuat preparat ulas kemudian difiksasi diatas api. Diberi larutan kristal violet selama 1 menit dan dicuci dengan air, lalu diberi larutan lugol selama 1 menit dan larutan pemucat selama 10–20 detik, dan dicuci dengan air. Terakhir diberikan larutan safranin selama 15 detik dan dicuci dengan air, kemudian dikeringkan dengan kertas saring, lalu diamati dengan mikroskop menggunakan perbesaran 10 x 100 (Hucker dalam lay, 1994).



Gambar. 6 tahapan pengecatan gram

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Operasional Reaktor

Operasional Reaktor dimulai dengan pengisian air limbah sintesis *greywater* pada ketiga reaktor. Setelah itu dilakukan proses aklimatisasi pada tumbuhan kangkung (*Ipomea aquatica f*) selama 8 hari agar supaya tanaman dapat beradaptasi dan mampu hidup di lingkungan yang baru.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 6 Kangkung air (*Ipomea aquatica f*) pada reaktor EFB

Setelah masa aklimatisasi, Kangkung air mengalami kematian diakibatkan karena kangkung air tidak dapat menahan beban organik yang tinggi. Selain menahan beban organik yang tinggi, kangkung air juga menunjukkan perubahan warna pada daun yang semula berwarna hijau menjadi warna kuning dan mengalami kematian.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 7 Kondisi Kangkung Air yang mengalami kematian

Setelah pengoperasian reaktor menggunakan kangkung air tidak berjalan sesuai dengan rencana, maka untuk tumbuhan diganti dengan menggunakan Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) sebagai tumbuhan baru. Menurut Lutfiana (2014) Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) memiliki ketahanan yang lebih tinggi dalam menyerap polutan, menyerap Nutrisi dan Zat-zat lain pada badan air. Setelah Eceng Gondok diletakkan ke dalam reaktor, kembali dilakukan proses aklimatisasi selama 8 hari dan setelah 8 hari Eceng Gondok mampu tumbuh dan berkembang biak di dalam reaktor.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gaambar. 8: Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) pada reaktor kontrol, EFB dan EFB+S

Setelah dilakukan proses aklimatisasi tumbuhan Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*), pengujian selanjutnya pada interval pada table 3.

Tabel. 5 Interval waktu pengujian sampel

Aklimatisasi	8 Hari			
Sampling Hari ke	0	12	24	48

Proses aklimatisasi tumbuhan pada reaktor dibutuhkan waktu 8 hari, setelah proses aklimatisasi selesai, dilakukan pengambilan sampel pada hari ke 0, 12, 24 dan 48 setelah proses aklimatisasi. Sampel-sampel yang sudah diambil berikutnya diuji kedalam Laboratorium Biotech Teknik Lingkungan FTSP UII.

-4.2 Isolasi dan Enumerasi Bakteri *Nitrobacter sp.* pada reaktor EFB

Pada penelitian ini, sumber isolat yang digunakan berupa sampel air pada reaktor kontrol, reaktor *Ecological floating bed* dan reaktor *Ecological floating bed* +spons. Sebanyak sembilan sampel yang akan diuji secara bertahap, yaitu sampel hari ke 0, hari ke 12, hari ke 24 dan hari ke 28 yang diberi kode isolat NB. Sebelum tahapan penelitian dilakukan, alat dan bahan di sterilisasi terlebih dahulu menggunakan *Autoclave* dengan tekanan 121°C. *Autoclave* berfungsi sebagai sterilisasi menggunakan uap secara merata sehingga alat dan bahan yang sudah disterilisasi menyebabkan mikroorganismenya mati.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 9 proses sterilisasi menggunakan *Autoclave*

Proses sterilisasi dengan *Autoclave* dimulai dengan cara membungkus media yang akan digunakan menggunakan kapas, Aluminium foil dan kertas buram.

Pembungkusan ini bertujuan agar alat dan media yang akan digunakan tidak akan pecah, tidak meleleh untuk media plastik dan air tidak dapat masuk kedalam media.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 10 Alat dan bahan yang telah dibungkus sebelum di sterilkan

Setelah alat dan bahan dibungkus, kemudian masukkan ke dalam *Autoclave* dengan mangatur suhu 121°C dengan waktu 60 menit.

Setelah melakukan sterilisasi alat dan bahan yang digunakan, selanjutnya Alat dan bahan yang akan digunakan pada tahapan selanjutnya dimasukkan kedalam *Laminar Air Flow* (LAF). *Laminar Air Flow* (LAF) berfungsi sebagai alat pendukung kegiatan penanaman mikroorganisme dengan prinsip kerja yaitu meniupkan udara steril secara terus menerus secara teratur. Sebelum LAF akan digunakan, nyalakan sinar UV pada LAF terlebih dahulu selama 15 menit agar supaya ketika pengerjaan, mikroorganisme yang tinggal di dalam LAF mati terlebih dahulu agar tidak terkontaminasi saat penanaman sampel ke media padat.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 11 *Laminar Air Flow* saat sterilisasi menggunakan sinar UV

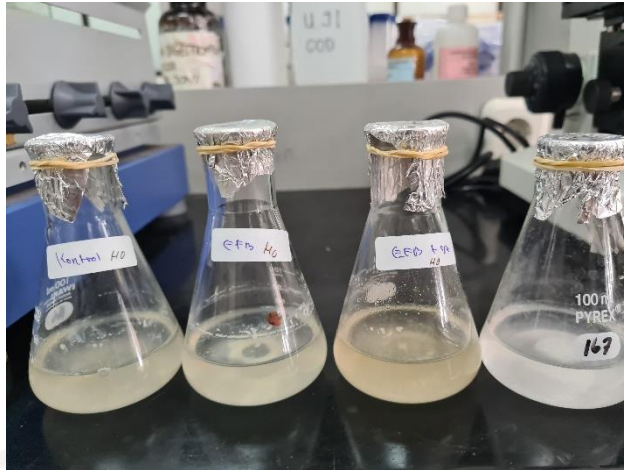
Isolasi dilakukan dengan mengambil masing-masing sampel sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* 50 ml dan diinokulasi ke dalam masing-masing media *Nutrient Broth* 45 ml selama 7 hari menggunakan shaker sampai terjadi perubahan warna menjadi kuning. Menurut Asadatur (2004), *Nutrient Broth* adalah medium yang memiliki kandungan ekstrak beef dan peptone untuk pertumbuhan baktri.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 12 inokulasi sampel pada *Nutrient Broth* dengan perubahan warna menjadi warna kuning.

Setelah dilakukan inkubasi sampel pada *Nutrient Broth*, isolasi dilakukan dengan mengambil masing-masing 5 ml inokulan diinokulasi kembali ke dalam media cair spesifik *nitrobacter* sp dan bacto agar 45 ml. Bacto agar berfungsi sebagai pertumbuhan bakteri dan memiliki tingkat kemurnian dibandingkan dengan agar-agar yang lainnya, sehingga lebih transparan dan sel-sel dari mikroba dapat lebih mudah dilihat. Kultur cair yang berisi isolat kemudian di-shaker selama 7 hari sampai terjadi perubahan warna menjadi keruh.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 13 media cair spesifik *Nitrobacter* sp

Pada gambar. 13 bisa dilihat perubahan warna yang terjadi, jika dibandingkan dengan media kontrol, perubahan warna terjadi dari warna bening menjadi warna keruh yang berarti menandakan bahwa adanya bakteri penghasil nitrat. Perubahan warna ini terjadi karena adanya perubahan pH media diakibatkan proses oksidasi bakteri nitrit menjadi nitrat.

Setelah dilakukan proses inokulasi bakteri pada media cair spesifik *nitrobacter* sp. selanjutnya media dipindahkan ke dalam LAF dan dilanjutkan penanaman.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 14 tahapan pelaksanaan menggunakan LAF

Tahapan awal melakukan pengenceran dengan cara mengambil 1 ml sampel pada media spesifik, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril

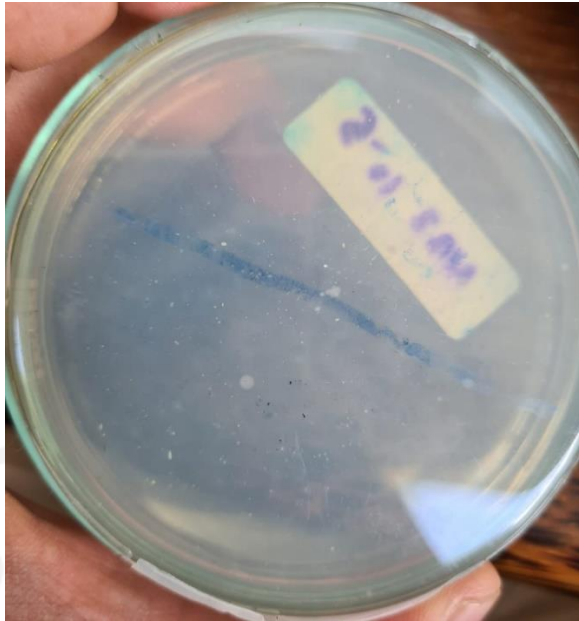
sebanyak 9 ml sampai pengenceran 10^{-6} . Hasil dari pengenceran yang diambil adalah pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} , dikarenakan pada pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} terlalu banyak sehingga tidak dapat dihitung dan tidak dapat dipisahkan. Hasil dari pengenceran kemudian dimasukkan ke dalam media padat bacto agar ditambah dengan media cair spesifik kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dan diinkubasi ke dalam inkubator selama 30 hari. Inkubasi bakteri *Nitrobacter* sp membutuhkan waktu yang cukup panjang, selama 30 hari dikarenakan pertumbuhan koloni bakteri di dalam media padat spesifik termasuk lambat, pada inkubasi 2x24 jam tidak ada sama sekali aktifitas koloni bakteri yang dapat dilihat secara visual, pada inkubasi selama 14 hari sudah dapat dilihat aktifitas pertumbuhan koloni tetapi belum dapat dihitung, pada inkubasi selama 30 hari aktifitas koloni bakteri sudah dapat dilihat secara visual dan dapat dilakukan perhitungan bakteri menggunakan *coclony counter*.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 15 Media padat spesifik inkubasi 2x24 jam *Nitrobacter* sp

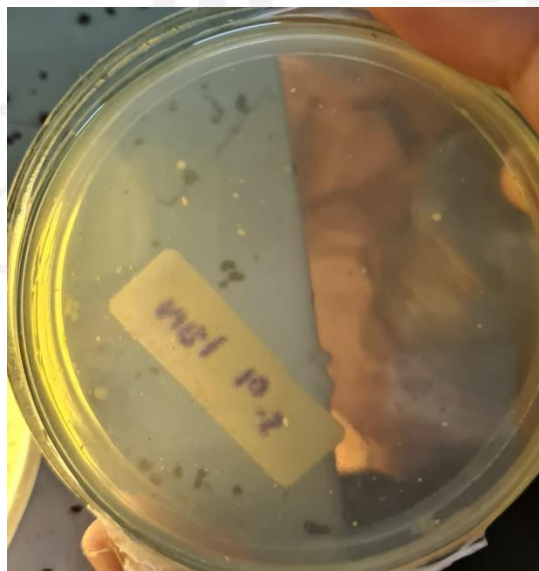
Gambar. 15 bisa dilihat secara visual pada inkubasi 2x24 jam belum ada aktifitas koloni media padat tersebut. Setelah dilakukan inkubasi, 2x24 jam dilanjutkan kembali pengamatan pada inkubasi 14 hari.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

Gambar. 16 Media padat spesifik inkubasi 14 hari *Nitrobacter* sp

Pada gambar. 16 dapat dilihat pertumbuhan koloni yang masih sedikit sehingga tidak dapat dihitung. Penyebab dari lambatnya pertumbuhan dari media padat spesifik ini disebabkan karena sumber carbon (C) dan nitrogen (N) pada media spesifik sangat sedikit sehingga menyebabkan pertumbuhan koloni bakteri yang lambat. Setelah melalui proses inkubasi selama 14 hari, inkubasi bakteri dilanjutkan kembali selama 30 hari.



Sumber: (Dokumentasi, 2020)

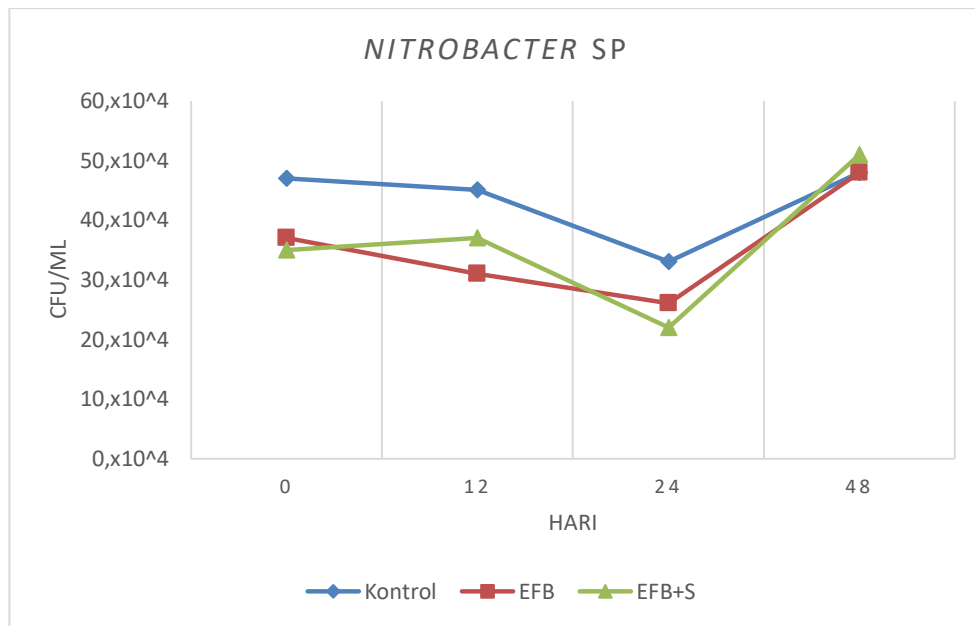
Gambar. 17 Media padat spesifik inkubasi 30 hari *Nitrobacter* sp

Setelah melalui proses inkubasi selama 30 hari, koloni bakteii penitrifikasi *Nitobaacter* sp dapat terlihat secara visual dan dapat dihitung menggunakan *Colony counter*. Selanjutnya perhitungan menggunakan *colony counter* selesai, jumlah koloni dalam media dapat dituangkan dalam bentuk tabel dibawah ini.

Tabel.6 Data Perhitungan *Nitrobacter* sp

REAKTOR	DENSITAS BAKTERI TIAP REAKTOR CFU/mL			PERBANDINGAN	DENSITAS BAKTERI CFU/mL	DENSITAS BAKTERI CFU/mL
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴			
KONTROL	40000000	300000	470000	85	470000	47x10 ⁴
EFB	18000000	3400000	370000	9	370000	37x10 ⁴
EFB DAN SPONS	21000000	3500000	210000		350000	35x10 ⁴
KONTROL	14000000	5400000	450000	12	450000	45x10 ⁴
EFB	25000000	4700000	310000	15	310000	31x10 ⁴
EFB DAN SPONS	37000000	1100000	160000		370000	37x10 ⁴
KONTROL	160000000	3300000	280000		330000	33x10 ⁴
EFB	26000000	11000000	300000		260000	26x10 ⁴
EFB DAN SPONS	7000000	2200000	40000		220000	22x10 ⁴
KONTROL	23000000	10300000	480000	21	480000	48x10 ⁴
EFB	66000000	2600000	480000	5	480000	48x10 ⁴
EFB DAN SPONS	21000000	1200000	510000		510000	51x10 ⁴

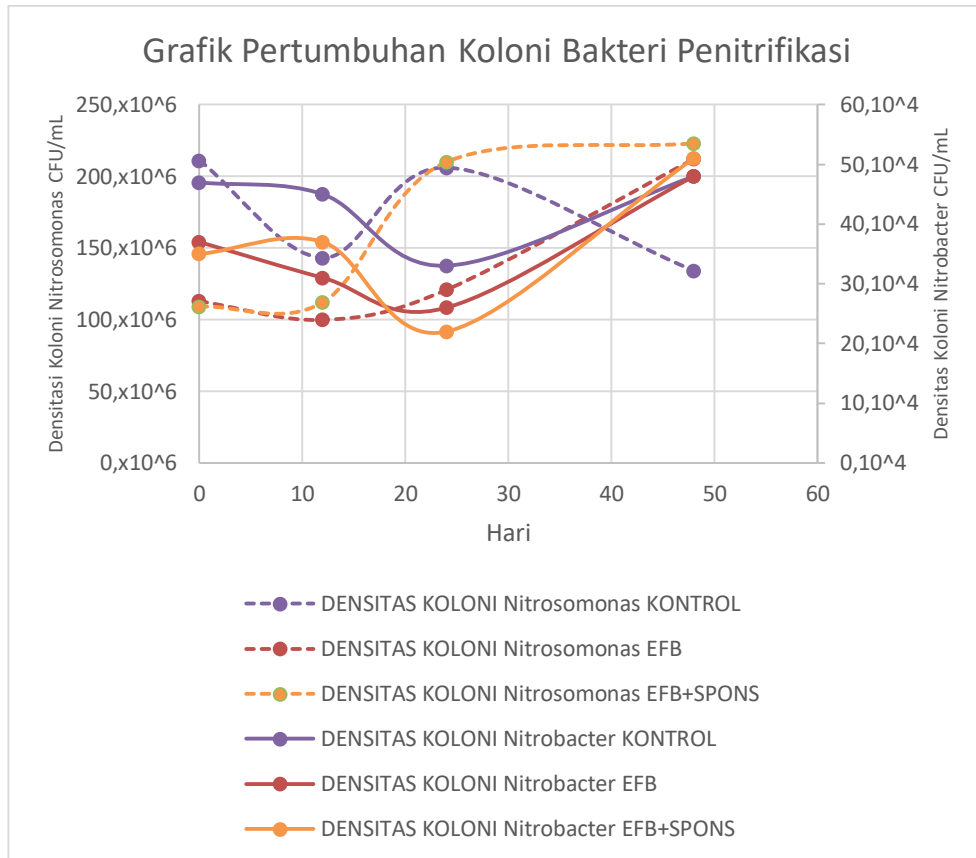
Dari perhitungan sampel hari ke 0, 12, 24, dan 48 kemudian dihitung kembali menggunakan metode *Standards Plate Counts* (SPC) yang tertera dalam table 6 didapatkan nilai rata-rata bakteri *Nitrobacter* sp pada masing-masing reaktor, yaitu pada sampel hari ke 0 didapatkan 47x10⁴ CFU/ml dalam Reaktor Kontrol, Reaktor EFB 37x10⁴ CFU/ml dan Reaktor EFB+S 35x10⁴ CFU/ml. Pada sampel hari ke 12 didapatkan 45x10⁴ CFU/ml, Reaktor EFB 31x10⁴ CFU/ml dan Reaktor EFB+S 37x10⁴ CFU/ml. Pada sampel hari ke 24 didapatkan 33x10⁶ CFU/ml dalam Reaktor kontrol, dalam Reaktor EFB 26x10⁴ CFU/ml dan Reaktor EFB+S 22x10⁴ CFU/ml. Pada sampel terakhir yaitu sampel hari ke 48 terdapat *Nitrobacter* sp dalam Reaktor kontrol sebanyak 48x10⁴ CFU/ml, Reaktor EFB sebanyak 48x10⁴ CFU/ml dan Reaktor EFB+S sebanyak 51x10⁴ CFU/ml. Jika dilihat dari data tersebut bisa dituangkan dalam bentuk kurva sebagai berikut.



Grafik.1 Pertumbuhan *Nitrobacter* sp. pada reaktor

Pada grafik.1, reaktor Kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+Spons berfungsi sebagai pembandingan untuk mengetahui kinerja reaktor kontrol yang hanya diisi dengan air limbah, reaktor EFB yang diberikan tanaman eceng gondok serta reaktor EFB+Spons yang diberikan eceng gondok dan media spons sebagai tempat berkembangbiaknya bakteri sehingga dapat diketahui reaktor yang paling efektif dalam menurunkan polutan dalam air limbah. dalam media Reaktor kontrol terjadi pertumbuhan bakteri *Nitrobacter* sp dari hari ke 0 sampai dengan hari ke 48 dikarenakan nutrisi yang terkandung di dalam reaktor kontrol diserap sendiri oleh *Nitrobacter* sp. Pada Reaktor EFB dan EFB+S hari ke 0 sampai dengan hari ke 12 masih mengalami peningkatan jumlah bakteri, akan tetapi pada hari ke 24 terjadi penurunan jumlah bakteri. Hal ini menunjukkan kadar nitrit yang menjadi sumber nutrisi bagi bakteri *Nitrobacter* sp menurun. Penurunan juga terjadi diakibatkan oleh berkurangnya nutrisi sebagai bahan makanan bakteri *Nitrobacter* sp. Pada penelitian ini memakai Eceng gondok sebagai fitoremediasi. Menurut Effendi (2003), Eceng gondok sebagai fitoremediasi bekerja sama dengan mikroorganisme dalam mengurangi zat-zat yang toksik menjadi kurang toksik dengan mengurangi sekitar 25% zat kontaminan.

Penelitian mengenai bakteri penitrifikasi juga melibatkan penelitian tentang *Nitrosomonas* sp yang berfungsi sebagai mengoksidasi amoniak menjadi nitrit dan berkembang biak pada masing-masing reaktor. Berikut grafik perkembangan *Nitrosomonas* sp dengan *Nitrobacter* sp pada masing-masing reaktor.



Grafik.2 Pertumbuhan *Nitrosomonas* sp. dan *Nitrobacter* sp.

Pada grafik. 2 pertumbuhan *Nitrosomonas* sp. secara umum memiliki peningkatan bakteri dari ke 0 sampai hari ke 48 dengan memiliki total bakteri tertinggi pada reaktor EFB+S hari ke 48 dengan bakteri yang berjumlah 223×10^6 CFU/ml. pada konsentrasi amoniak dalam penelitian Ridwan (2021), konsentrasi amoniak mengalami penurunan pada hari ke 24 konsentrasi rendah dengan konsentrasi amoniak 0,24 mg/l reaktor kontrol, 3,09 mg/l reaktor EFB dan 0,14 mg/l reaktor EFB+Spons. Penurunan amoniak diikuti langsung dengan kenaikan konsentrasi nitrit dan nitrat, ini menunjukkan bahwa sebagian besar penurunan amoniak disebabkan oleh reaksi nitrifikasi. Pada tahapan selanjutnya (konsentrasi tinggi), konsentrasi amoniak turun secara bertahap hingga hari ke 48 konsentrasi amoniak pada reaktor kontrol berjumlah 32,73 mg/l, reaktor EFB 24,91 mg/l dan

reaktor EFB+Spons 9,24 mg/l, sedangkan konsentrasi NO_3 terjadi penurunan diakibatkan proses denitrifikasi yang mengubah nitrat menjadi nitrogen.

Dengan adanya bakteri *Nitrosomonas* sp dapat mengoksidasi kadar ammoniak menjadi nitrit. Dapat dilihat dari penelitian

Selanjutnya koloni bakteri yang menunjukkan morfologi yang sama, dipindahkan ke media agar miring. Pembuatan media agar miring bertujuan untuk menumbuhkan dan menyimpan biakan murni sebagai stok untuk dipakai pada penelitian selanjutnya.



Sumber: (Dokumentasi, 2021)

Gambar. 18 Media padat agar miring

Pembuatan media agar miring dilakukan dengan cara melakukan sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan seperti media Nutrient agar dan tabung reaksi sebagai wadah pertumbuhan media. Setelah dilakukan sterilisasi, alat dan bahan dimasukkan ke dalam LAF. Media nutrient agar selanjutnya diambil sebanyak 20 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu tabung reaksi dimasukkan ke dalam incubator dengan posisi miring dan biarkan sampai agar membeku. Setelah agar membeku, penanaman bakteri dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam media agar miring dengan menggores permukaan media agar miring sehingga koloni bakteri yang dipindahkan akan menyebar. Setelah melakukan penanaman koloni bakteri di dalam media agar miring, selanjutnya media agar miring di inkubasi ke dalam inkubator.

4.3 Pengaruh bakteri *Nitrobacter* sp. terhadap penurunan Nitrit dan Nitrat

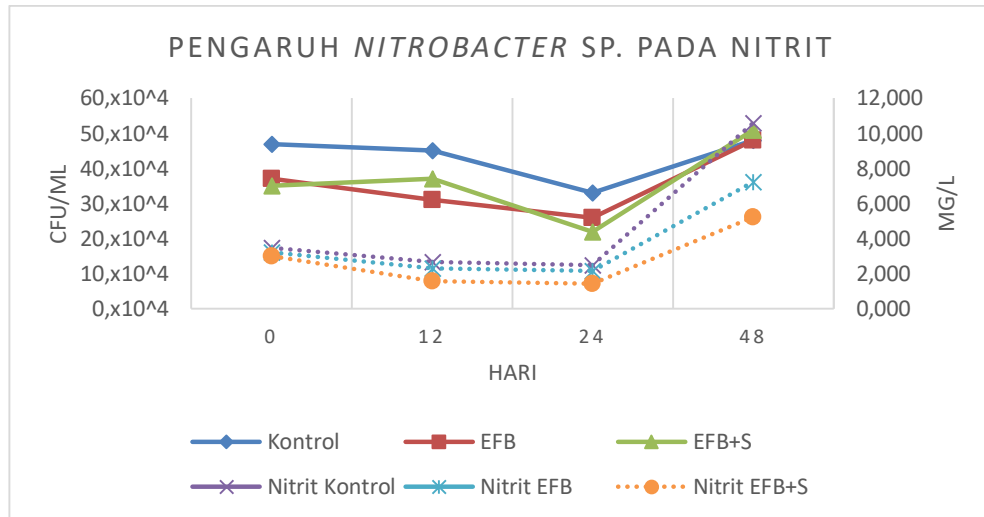
Berdasarkan hasil penelitian dari Rozin dkk, 2020. Jumlah nitrit dan nitrat pada reaktor kontrol, EFB dan EFB+S didapatkan hasil nitrit dan ntrat pada tabel sebagai berikut.

Tabel.7 Hasil pengujian Nitrit dan Nitrat

Tanggal	Hari Ke-	Kontrol	EFB	EFB+SPONS
Konsentrasi Rendah				
12/10/2020	0	3.49	3.21	2.98
13/10/2020	1	3.50	3.23	3.00
14/10/2020	2	3.49	3.22	2.99
15/10/2020	3	3.29	2.87	2.49
16/10/2020	4	3.13	2.82	2.31
19/10/2020	7	2.71	2.41	1.82
22/10/2020	10	2.65	2.32	1.56
26/10/2020	14	2.55	2.22	1.45
2/11/2020	20	2.50	2.17	1.42
Efisiensi Removal (%)		28.38	32.45	52.18
Konsentrasi Tinggi				
9/11/2020	27	12.53	11.37	10.05
10/11/2020	28	12.50	11.32	10.01
11/11/2020	29	12.49	11.26	9.94
24/11/2020	42	10.90	8.18	6.49
25/11/2020	43	10.85	8.10	6.45
26/11/2020	44	10.78	8.00	6.40
30/11/2020	48	10.57	7.23	5.22
3/12/2020	51	10.37	6.56	4.28
7/12/2020	55	10.18	5.88	3.34
Efisiensi Removal (%)		18.70	48.25	66.74
No	Hari Ke-	Kontrol	EFB	EFB+SPONS
Konsentrasi Rendah				
12/10/2020	0	4.97	4.96	4.77
13/10/2020	1	4.98	4.97	4.78
14/10/2020	2	4.97	4.96	4.77
15/10/2020	3	4.94	4.84	4.73
16/10/2020	4	4.92	4.76	4.69
19/10/2020	7	4.72	4.66	4.63
22/10/2020	10	4.68	4.64	4.62
26/10/2020	14	4.68	4.62	4.61
2/11/2020	20	4.64	4.61	4.42
Efisiensi Removal (%)		6.58	6.97	7.27
Konsentrasi Tinggi				
9/11/2020	27	16.59	16.27	15.38
10/11/2020	28	16.50	16.10	15.09
11/11/2020	29	16.41	16.08	15.02
24/11/2020	42	15.36	11.92	7.82
25/11/2020	43	15.32	11.77	7.61
26/11/2020	44	15.15	11.51	7.52
30/11/2020	48	14.84	10.63	7.19
3/12/2020	51	14.63	9.99	6.84
24	55	14.59	9.91	6.43
Efisiensi Removal (%)		12.03	39.06	58.20

Sumber: (Rozin, 2020)

Berdasarkan hasil nitrit dan nitrat yang tertuang dalam tabel 7, pengaruh *Nitrobacter* sp. terhadap penurunan nitrit dan menjadi nitrat dapat ditunjukkan dalam kurva sebagai berikut.



Grafik.3 Pengaruh *Nitrobacter* sp. pada nitrit

Pada grafik.3 pengaruh *Nitrobacter* sp. dengan nitrit dan nitrat menunjukkan bahwa isolat bakteri *Nitrobacter* sp. hari ke 0 pada reaktor kontrol sebanyak 47×10^4 CFU/ml dapat mengoksidasi 3,49 mg/L nitrit menjadi 4,97 mg/L nitrat, reaktor EFB *Nitrobacter* sp. sebanyak 31×10^4 CFU/ml dapat mengoksidasi 3,21 mg/L nitrit menjadi 4,96 nitrat dan reaktor EFB+S *Nitrobacter* sp. sebanyak 35×10^4 CFU/ml dapat mengoksidasi 2,98 mg/L nitrit menjadi 4,77 mg/L nitrat.

Selanjutnya pada penelitian hari ke 12 isolat bakteri *Nitrobacter* sp. pada reaktor kontrol sebanyak 45×10^4 CFU/ml dapat mengoksidasi 3,65 mg/L nitrit menjadi 4,68 mg/L nitrat, reaktor EFB *Nitrobacter* sp. sebanyak 31×10^4 CFU/ml dapat mengoksidasi 2,32 mg/L nitrit menjadi 4,68 nitrat dan reaktor EFB+S *Nitrobacter* sp. sebanyak 37×10^4 CFU/ml dapat mengoksidasi 1,56 mg/L nitrit menjadi 4,62 mg/L nitrat.

Pada penelitian hari ke 24 isolat bakteri *Nitrobacter* sp. pada reaktor kontrol sebanyak 33×10^6 CFU/ml dapat mengoksidasi 3,50 mg/L nitrit menjadi 4,64 mg/L nitrat, reaktor EFB *Nitrobacter* sp. sebanyak 26×10^6 CFU/ml dapat mengoksidasi 2,17 mg/L nitrit menjadi 4,61 nitrat dan reaktor EFB+S *Nitrobacter* sp. sebanyak 22×10^6 CFU/ml dapat mengoksidasi 1,42 mg/L nitrit menjadi 4,42 mg/L nitrat.

Penelitian terakhir, yaitu hari ke 24 isolat bakteri *Nitrobacter* sp. pada reaktor kontrol sebanyak 48×10^6 CFU/ml dapat mengoksidasi 10,57 mg/L nitrit menjadi 14,84 mg/L nitrat, reaktor EFB *Nitrobacter* sp. sebanyak 48×10^6 CFU/ml dapat mengoksidasi 7,23 mg/L nitrit menjadi 10,63 nitrat dan reaktor EFB+S *Nitrobacter* sp. sebanyak 51×10^6 CFU/ml dapat mengoksidasi 5,22 mg/L nitrit menjadi 7,19 mg/L nitrat.

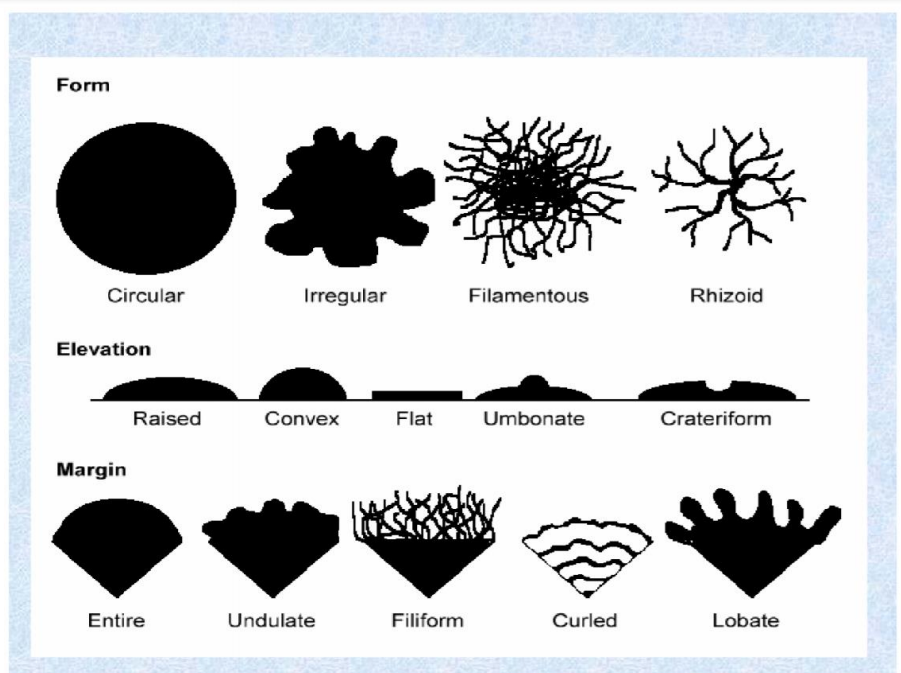
Berdasarkan hasil yang diperoleh tersebut, dapat dikatakan bahwa isolat *Nitrobacter* sp. memiliki kemampuan nitrifikasi paling optimal yaitu isolat *Nitrobacter* sp. pada reaktor EFB+Spons karena pada konsentrasi rendah isolat ini dapat meremoval sebanyak 52,18% nitrit dan pada konsentrasi tinggi isolat ini dapat meremoval sebanyak 66,74%.

4.4 Karakteristik Koloni Bakteri *Nitrobacter* sp.

Karakteristik koloni bakteri *Nitrobacter* sp. akan diamati menggunakan pengamatan makroskopis dan mikroskopis.

4.4.1 Pengamatan bakteri secara Makroskopis

Pengamatan bakteri secara makroskopis dapat dilakukan secara visual, yaitu dengan mengamati bentuk koloni. Koloni biasanya berbentuk seperti akar, filament, tidak berbentuk dan bulat. Pada tepian koloni biasanya berbentuk utuh, berombak dalam, berombak dangkal dan halus. Sedangkan pada elevasi koloni berbentuk elevasi cembung, rata, rendah dan cembung dengan permukaan koloni kasar atau halus (Cappucino & Sherman, 1978).

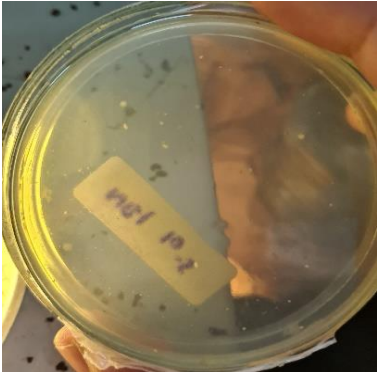


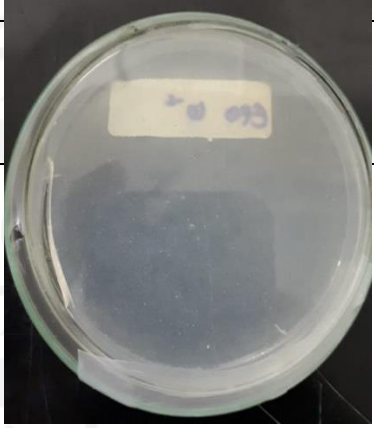
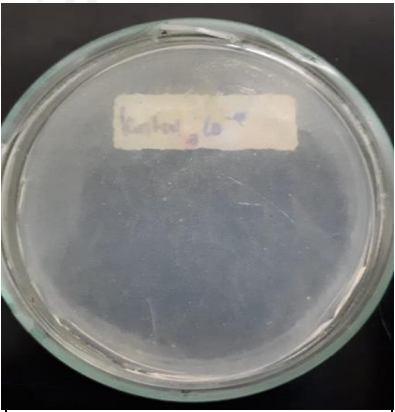
Sumber: (Dharmawangsa, 2016)

Gambar. 18 Bentuk-bentuk koloni

pada penelitian ini, bakteri *Nitrobacter* sp pada media padat bisa diamati menggunakan pengamatan Makroskopi yang bias dilihat dalam table.8 sebagai berikut.

Tabel.8 Hasil pengamata morfologi secara makroskopis

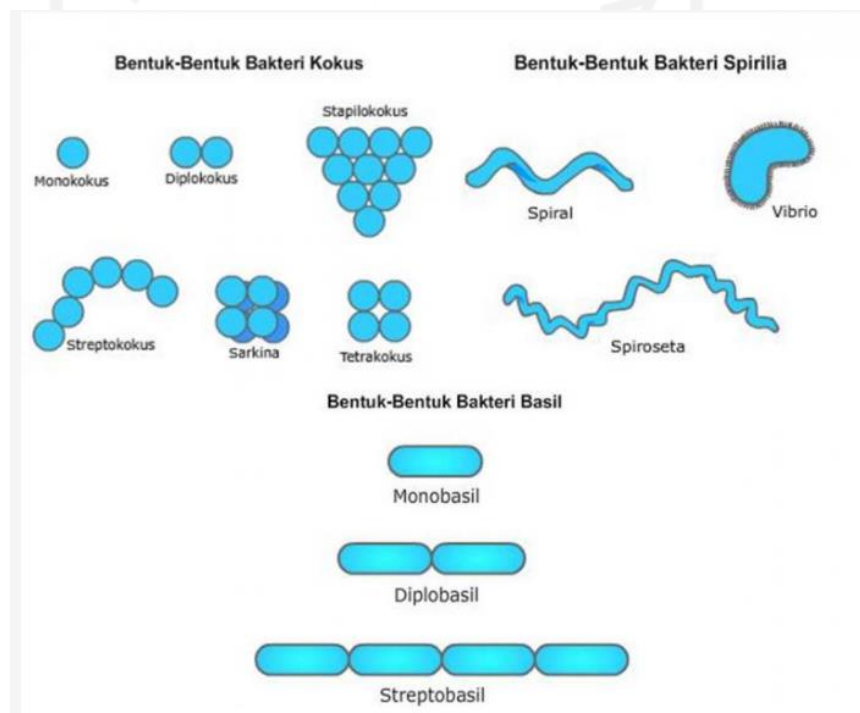
No	Isolat	Ciri Pertumbuhan					Gambar
		Warna	Prmukaan	Bentuk	Tepi	Elevasi	
1	NB Kontrol	Putih	Halus	Sirkular	Rata	Cembung	

2	NB EFB	Putih	Halus	Irreguler	Rata	Cembung	
3	NB EFB+Spons	Putih	Halus	Sirkular	Rata	Cembung	

Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan di 3 (tiga) morfologi yang berbeda, ke 3 isolat memiliki kemiripan warna semua, yaitu berwarna dasar putih, memiliki permukaan yang halus. Pada reaktor Kontrol dan EFB+Spons memiliki bentuk sirkular (melingkar) sedangkan pada isolat pada reaktor EFB memiliki bentuk irregular (tidak beraturan). Ke 3 isolat memiliki tepi yang sama, yaitu rata dan elevasi yang cembung.

4.4.2 Pengamatan bakteri secara Mikroskopis

Pengamatan bakteri secara mikroskopi dilakukan dengan cara mengamati bentuk sel bakteri, ukuran bakteri, pewarnaan endospore dan pewarnaan gram. Pada pengamatan mikroskopis membutuhkan alat seperti mikroskop untuk melihat sifat objek yang tidak bias dilihat menggunakan mata telanjang.



Sumber: (Almansyahnis, 2019)

Gambar. 19 Bentuk-bentuk bakteri

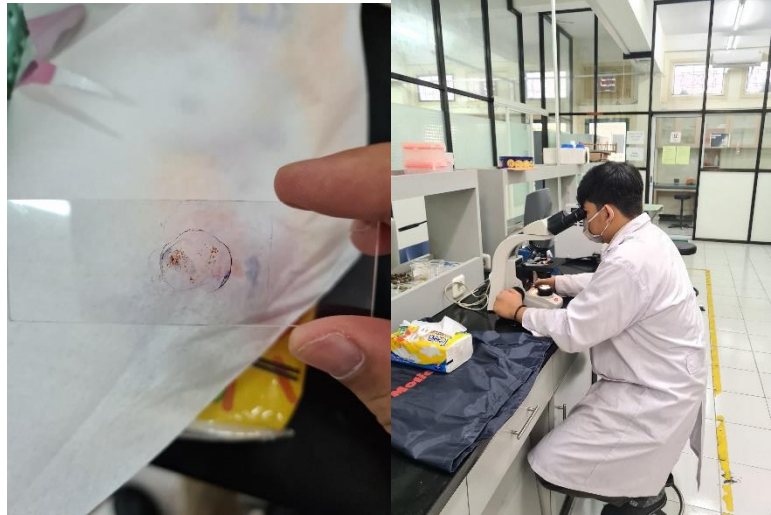
Bakteri *Nitrobacter* sp. akan diamati melalui pengamatan mikroskopis dalam pewarnaan gram dan dilihat menggunakan mikroskop. Pewarnaan gram dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan seperti preparat mikroskop, Gram A (Kristal violet), Gram B (Lugol), Gram D (safranin), larutan pemucat (Alkohol 70%), Bunsen, jarum ose, pipet dan aquades.



Sumber: (Dokumentasi, 2021)

Gambar. 19 Alat dan bahan pewarnaan gram

Tahapan pewarnaan gram dimulai dengan mengammbil preparat mikroskop di fiksasi menggunakan alkohol dan api Bunsen. Selanjutnya menuangkan aquades menggunakan pipet tetes pada preparat mikroskop. Setelah itu, mengambil isolat bakteri menggunakan jarum ose yang sudah di fixaxi terlebih dahulu menggunakan api bunsen. Setelah bakteri diambil, gesekkan jarum ose ke dalam praparat yang sudah berisi aquades sampai warna aquades memucat dan di fixaxi lagi menggunakan Bunsen sampai aquades di dalam preparat hilang dan membentuk kerak. Fixaxi ini bertujuan untuk membunuh isolat bakteri yang sudah dipindahkan agar lebih mudah dalam tahapan selanjutnya. Praparat yang sudah berisisi isolat bakteri selajutnya ditetaskan larutan Gram A sebanyak 1 tetes selama 1 menit, kemudian di basuh enggunakan aquades. Setelah itu, preparat kemudian ditetaskan kembali menggunakan Gram B selama 1 menit kemudia dibasuh kembali menggunakan aquades. Selanjutnya preparat kembali ditetaskan menggunakan larutan pemucat (alkohol) selama 30 detik dan dibasuh kembali menggunakan air. Pada tahap akhir, tetaskan safranin (Gram D) selama 15 detik kemudian dibasuh kembali menggunakan air dan preparat siap diuji ke dalam mikroskop dengan perbesaran 100x.



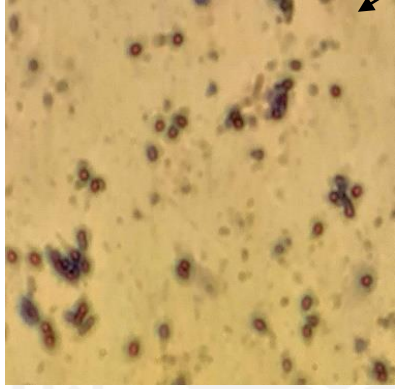
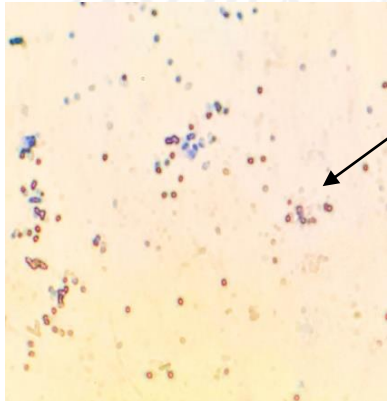
Sumber: (Dokumentasi, 2021)

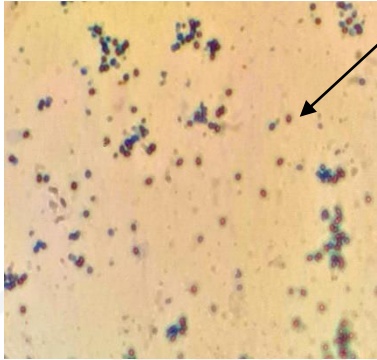
Gambar. 20 Preparat mikroskop yang siap diuji dan pengujian preparat menggunakan mikroskop.

Pada pengecatan gram, pengecatan menggunakan gram A yang berfungsi sebagai pemberi warna mikroorganisme target. Pada saat diberikan gram A, semua mikroorganisme akan berwarna ungu. Sesuai dengan urutan pengecatannya, selanjutnya pewarnaan gram menggunakan gram B yang berfungsi sebagai memfiksasi cat primer yang diserap mikroorganisme target sehingga pengikat warna oleh bakteri akan lebih kuat. Selanjutnya pemberi larutan pemucat (Alkohol 95%) memiliki 2 fungsi, yaitu mikroorganisme akan tetap berwarna ungu, karena tahan terhadap alkohol karena ikatan antara cat dan bakteri tidak akan luntur oleh alkohol. Bakteri tersebut disebut bakteri gram positif. Berbeda dengan bakteri gram positif, bakteri gram negatif akan tidak berwarna, karena tidak tahan terhadap alkohol dan ikatan bakteri dengan cat akan luntur oleh alkohol. Pada pewarnaan gram D berfungsi sebagai memberikan warna mikroorganisme non target dengan cat nya yang memiliki spectrum warna berbeda dari cat primer. Akibat pemberian gram D, akan terjadi 2 kemungkinan, yaitu bakteri gram positif tetap berwarna ungu karena jenuh mengikat gram A sehingga tidak mampu mengikat gram D dan bakteri gram negatif akan berwarna merah, karena cat sebelumnya telah dilunturkan oleh alkohol maka akan mampu mengikat gram D.

Setelah melakukan pengamatan dengan mikroskop, morfologi isolat *Nitrobacter* sp. dapat diamati dan dituangkan dalam bentuk tabel sebagai berikut.

Tabel.9 Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopis

No	Isolat	Gambar	Gram	bentuk	Perbesaran mikroskop
1	NB Kontrol		Negatif	kokus	100x
2	NB EFB		Negatif	kokus	

3	NB EFB+spons		Negatif	Kokus	
---	-----------------	---	---------	-------	--

Menurut Betser (1979), *Nitrobacter* sp. memiliki sel berbentuk batang pendek, pleomorfik, seringkali berbentuk pears, Gram negatif, dan non motil. Habitat bakteri ini tersebar pada tanah, air tawar, dan air laut. *Nitrobacter* mengoksidasi ion nitrit menjadi ion nitrat. Proses ini merupakan salah satu proses yang terjadi pada daur nitrogen. *Nitrobacter* akan tumbuh optimal pada suhu 28⁰ C dan memiliki pH optimum antara 7,3 dan 7,5 serta akan mati pada suhu 120⁰F (49⁰ C) atau di bawah 32⁰F (0⁰C). *Nitrobacter* sp. disebut bakteri nitrifikasi karena dapat mengubah amonium menjadi nitrit dan selanjutnya mengubah nitrit menjadi nitrat.

Pada hasil pengamatan secara mikroskopis, berdasarkan gambar. 19 bentuk-bentuk bakteri dibagi menjadi 3, yaitu bakteri berbentuk bulat (kokus), bakteri berbentuk batang (basil) dan bakteri berbentuk lengkung (spiral), didapatkan dalam isolat *Nitrobacter* sp. pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+Spons mempunyai bentuk yang sama, yaitu kokus dan memiliki Gram negatif yang berdasarkan bentuk selnya berwarna merah.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari penelitian yang dilakukan, Isolasi dan Enumerasi bakteri penitrifikasi (*Nitrobacter* sp.) pada *Ecological Floating Bed* (EFB) dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil isolasi bakteri *Nitrobacter* sp. pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+Spons, di FTSP UII, diperoleh 36 isolat bakteri nitrifikasi.
2. Dari hasil isolasi *Nitrobacter* sp, reaktor EFB+S hari ke 24 mempunyai hasil isolat terbanyak, yaitu sebanyak 51×10^4 CFU/ml.
3. Hasil pengamatan morfologi sel dan pewarnaan gram menunjukkan bahwa isolat bakteri nitrifikasi (*Nitrobacter* sp.) yang diperoleh semua isolat memiliki bentuk bulat (kokus) dan bakteri tergolong gram negatif

5.2 Saran

Penelitian disarankan untuk melanjutkan ke uji bakteri denitrifikasi (*Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Paracoccus denitrificans*) yang mempunyai kemampuan untuk mereduksi nitrat menjadi nitrogen bebas.



“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Amionik dan Fosfat dalam Air Limbah Laundry di Kawasan Keputih menggunakan Karbon Aktif. Akta Kimia Indonesia, Surabaya/ 3(1), 127-140*
- Abdullah A. (2004). *Pengaruh Penambahan Khitosan terhadap Mutu Agar Bakto (Bacto Agar)*. Bandung: InstitutPertanian Bogor.
- Belser LW. (1979). *Population ecology of nitrifying bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 33: 309–333.*
- Champbell, Neil A, dkk. (2004). *Biologi Edisi Kedua*. Erlangga. Jakarta.
- Chen, C. J., Zhang, R., Wang, L., Wu, W. X. & Chen, Y. X. (2013). *Removal of nitrogen from wastewater with perennial ryegrass/artificial aquatic mats bioflm combined system*. (Vol. 25(4), pp. 670–676). *J. Environ. Sci.*
- Chussetijowati J, et al. (2010). *Fitoremediasi Radionuklida 134Cs Dalam Tanah Menggunakan Tanaman Bayam (Amaranthus sp.)*. Prosiding Seminar Nasional ke-16 Teknologi dan Keselamatan PLTN Serta Fasilitas Nuklir.ITS. Surabaya.
- Eddy, Syaiful. (2009). *Jurnal Pemanfaatan Teknik Fitoremediasi Pada Lingkungan Tercemar Timbal (Pb)*. Universitas PGRI Palembang.
- Eddy, Syaiful. (2010). *Jurnal Kemampuan Enceng Gondok Sebagai Agen Fitoremediasi Air Tercemar Timbal (Pb)*. Universitas PGRI Palembang.
- Effendi H, (2003). *Telaah Kualitas Air*. Yogyakarta: Kanisius.
- Guo, Y. M. et al. (2014). *A restoration-promoting integrated floating bed and its experimental performance in eutrophication remediation*. *J. Environ. Sci.* Vol. 26, pp. 1090–1098.
- Hanrahan, G., Paulo Gardoinski, Martha Gledill, and Paul Worsfold. (2002). *Environmental Monitoring of Nutrients*, dalam *Environmental Monitoring Handbook*, Frank R. Burden (editor), McGraw-Hill, New York
- Hefni Effendi. (2003). *Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Herlambang, A., Marsidi, R., (2003). *Proses Denitrifikasi dengan Sistem Biofilter*

untuk Pengolahan Air Limbah yang mengandung Nitrat. Vol 4(1), pp. 46-55.
Jurnal Teknologi Lingkungan.

- International Water Association (IWA). Constructed Wetlands for Pollution Control: Processes, Performance, Design and Operation.* (IWA Publishing, 2000).
- Karil, A. R. F., Yusuf, M., & Maslukah, L. (2015). *Studi sebaran konsentrasi nitrat dan fosfat di perairan Teluk Ujungbatu Jepara.* *Journal of Oceanography*, (Vol. 4(2), pp. 386- 392).
- Komarwidjaya, W. (2005), *Rumput laut Gracilaria sp, sebagai Fitoremediasi Bahan Organik Perairan Tambak Budidaya.* (Vol 6(2), pp. 410-415). *Jurnal Teknik Lingkungan, P3TL-BPPT*,
- Knowles, P., Dotro, G., Nivala, J. & García, J. (2011). *Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors.* *Ecol. Eng.* (Vol. 37, pp. 99–112)
- Kusuma, L. A. (2009). *Kultur Jaringan Tumbuhan Jarak.*
<https://leqi.wordpress.com/2007/aklimatisasi-bibit-hasil-kultur-jaringan.pdf>.
- Li, M., Wu, Y.J., Yu, Z.L., Sheng, G.P., Yu, H.Q., (2007). *Nitrogen removal from eutrophic water by floating-bed-grown water spinach (Ipomoea aquatica Forsk.) with ion implantation.* *Water Research* (Vol. 41, pp. 3152-3158).
- Li, M., Wu, Y. J., Yu, Z. L., Sheng, G. P. & Yu, H. Q. (2007). *Nitrogen removal from eutrophic water by foating-bed-grown water spinach (Ipomoea aquatica Forsk.) with ion implantation.* *Water Res.* (Vol 41, pp. 3152–3158)
- Li, X. N., Song, H. L., Li, W., Lu, X. W. & Nishimura, O. (2010). *An integrated ecological foating-bed employing plant, freshwater clam and bioflm carrier for purifcation of eutrophic water.* *Ecol. Eng.* (Vol. 36, pp. 382–390).
- Lutfiana Sari Indah, Boedi Hendrarto, Prijadi Soedarsono. (2014). *Kemampuan Eceng Gondok (Eichhornia sp.), Kangkung Air (Ipomeasp.), Dan Kayu Apu (Pistia sp.) Dalam Menurunkan Bahan Organik Limbah Industri Tahu.* Universitas Diponogoro. Semarang
- Murti, R. Setiya dan C. Maria H.P. (2014). *Optimasi Waktu Reaksi Pembentukan*

- Kompleks Indofenol Biru Stabil Pada Uji N-Amonia Air Limbah Industri Penyamakan Kulit Dengan Metode Fenat.* (Vol.30 No.1 Juni 2014, pp 29-34). Majalah Kulit, Karet, dan Plastik.
- Nugroho, E, dan Sutrisno. (2008). *Budidaya Ikan dan Sayuran dengan Sistem Akuaponik*. Penebar Swadaya.Jakarta.
- Nurrohman, Rian. (2016). *Oxidation Ditch Algae Reaktor (ODAR) Dalam Pengolahan Nutrien Pada Limbah Greywater Perkotaan*. Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta.
- Rahmawana AJ, Effendi H, Suprihatin. *Potensi rumput vetiver (Chrysopogon zizanoides L.) dan kangkung (Ipomoea aquatica Forsk.) sebagai agen fitoremediasi limbah industri kayu.*
- Sheng, Y. Q., Qu, Y. X., Ding, C. F., Sun, Q. Y. & Mortimer, R. J. G. A. (2013). *combined application of diferent engineering and biological techniques to remediate a heavily polluted river. Ecol. Eng.* (Vol. 57, pp. 1–7)
- Soedjono, E. S., et al (2010). *Buku Refrensi Opsi Sistem dan Teknologi Sanitasi*. Tim Teknis Pembangunan Sanitasi.
- Soeprbowati, T.R. & Suedy, S.W.A., (2010). *Status Trofik Danau Rawa Pening dan Solusi Pengelolaannya* (Vol. 18(2005), pp.158–169). Jurnal Sains dan Matematika.
- Sutamihardja, R. T. M., Azizah, M., & Hardini, Y. (2018). *Studi dinamika senyawa fosfat dalam kualitas air sungai ciliwung hulu kota bogor.* (Vol 8(1), pp. 43-49). Jurnal Sains Natural.
- Utomo, W. P., Nugraheni, Z. V., Rosyidah, A., Shafwah, O. M., Naashihah, L. K., Nurfitriya, N., & Ullfindrayani, I. F. (2018). *Penurunan Kadar Surfaktan*
- Wardhana, W.A. (2001). *Dampak Pencemaran Lingkungan (Edisi revisi)*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Yusuf, G. (2001). Tesis.*Proses Bioremediasi Limbah Rumah Tangga dalam Skala Kecil dengan Kemampuan Tanaman Air pada Sistem Simulasi*.Institut Pertanian Bogor.
- Lawrence, J.R., Thomas R. Neu, and Kevin C. Marshall, (2002), *Colonization,*

Adhesion, Aggregation, and Biofilm, dalam Christon J Hurst, Manual of Environmental Microbiology, 2nd ed., ASM Press, Washington,D.C.



LAMPIRAN

Lampiran 2 Perhitungan jumlah bakteri *Nitrobacter* sp.

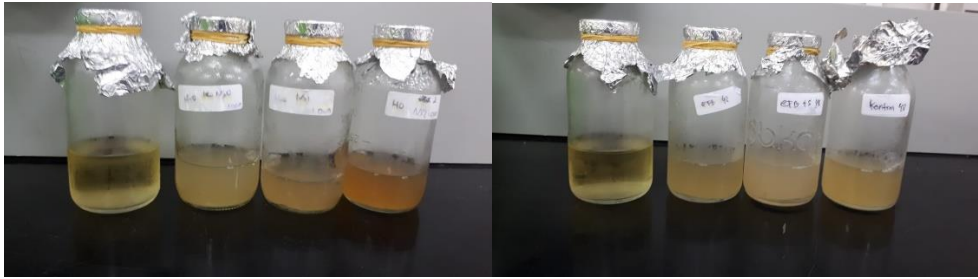
Tabel. 10 Data perhitungan *Nitrobacter* sp. yang tumbuh pada medium padat Spesifik.

REAKTOR	DENSITAS BAKTERI TIAP REAKTOR CFU/mL			PERBANDINGAN	DENSITAS BAKTERI CFU/mL	DENSITAS BAKTERI CFU/mL
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴			
KONTROL	4000000	300000	470000	85	470000	47x10 ⁴
EFB	18000000	3400000	370000	9	370000	37x10 ⁴
EFB DAN SPONS	21000000	3500000	210000		350000	35x10 ⁴
KONTROL	14000000	5400000	450000	12	450000	45x10 ⁴
EFB	25000000	4700000	310000	15	310000	31x10 ⁴
EFB DAN SPONS	37000000	1100000	160000		370000	37x10 ⁴
KONTROL	160000000	3300000	280000		330000	33x10 ⁴
EFB	26000000	11000000	300000		260000	26x10 ⁴
EFB DAN SPONS	7000000	2200000	40000		220000	22x10 ⁴
KONTROL	23000000	10300000	480000	21	480000	48x10 ⁴
EFB	66000000	2600000	480000	5	480000	48x10 ⁴
EFB DAN SPONS	21000000	1200000	510000		510000	51x10 ⁴

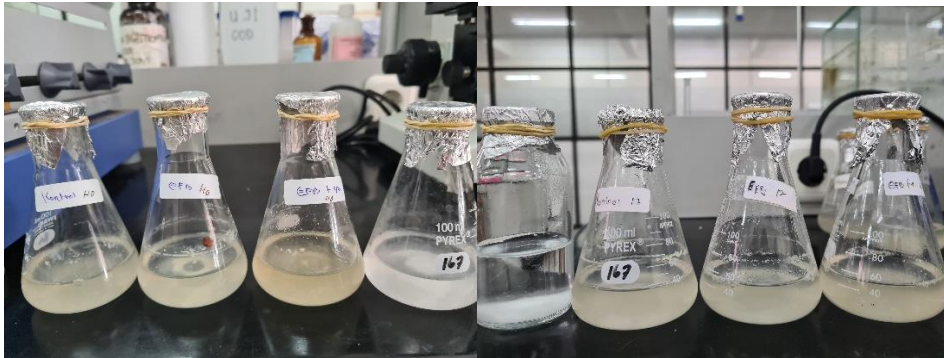
PERTUMBUHAN KOLONI			
HARI	DENSITAS KOLONI		
	KONTROL	EFB	EFB+SPONS
0	470000	370000	350000
12	450000	310000	370000
24	330000	260000	220000
48	480000	480000	510000

Lampiran 2 inokulasi sampel pada *nutrient broth*

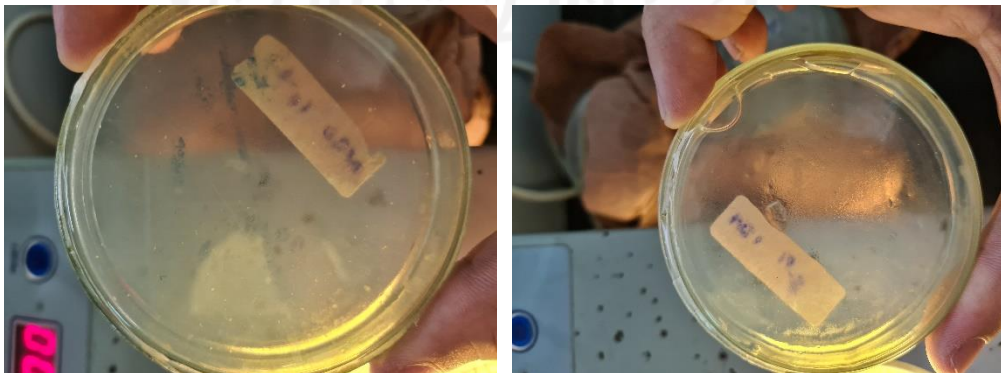


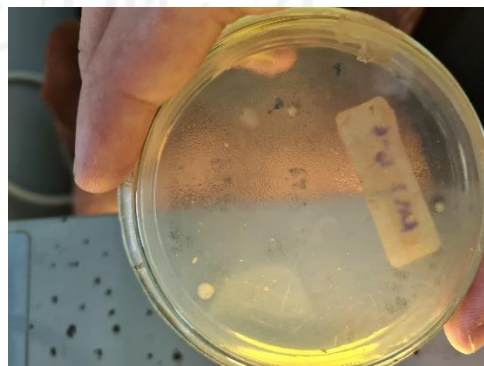
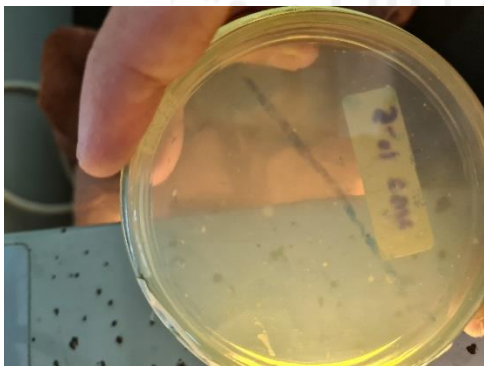
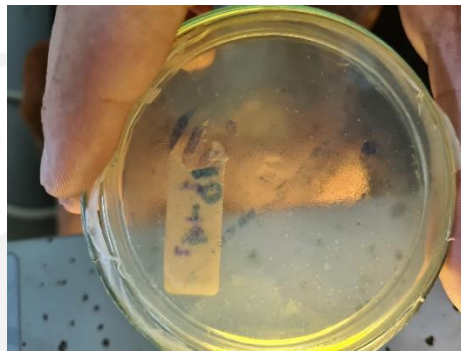
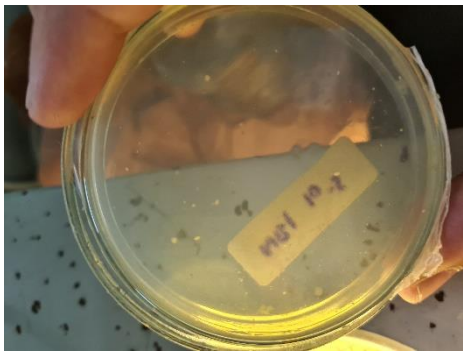
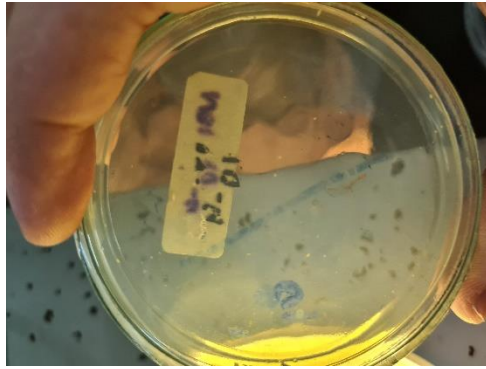


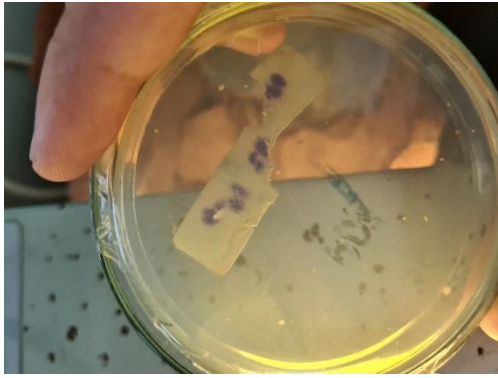
Lampiran 3 inokulasi sampel pada media spesifik *Nitrobacter* sp.



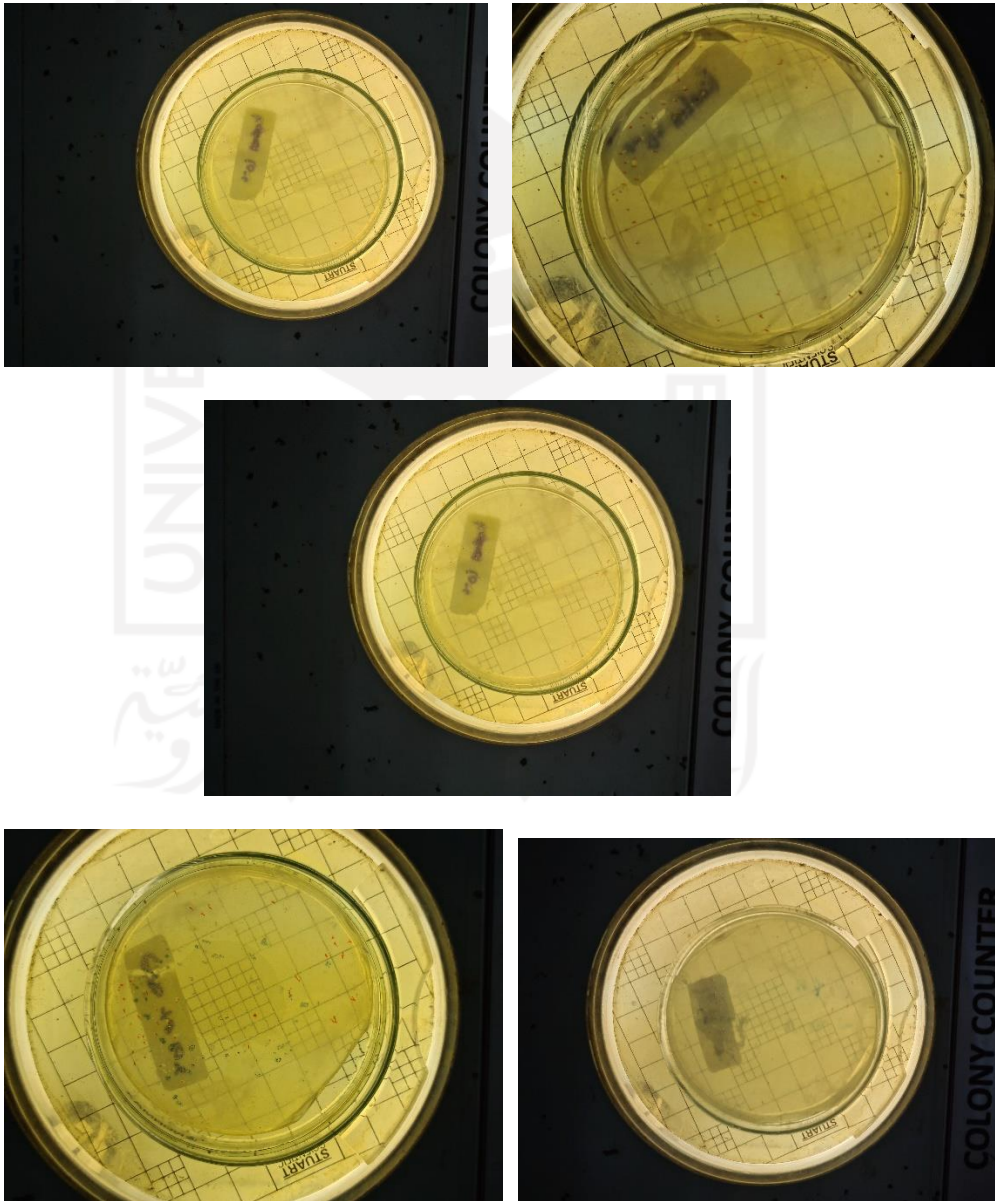
Lampiran 4 Hasil isolasi bakteri hari 0 pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+S

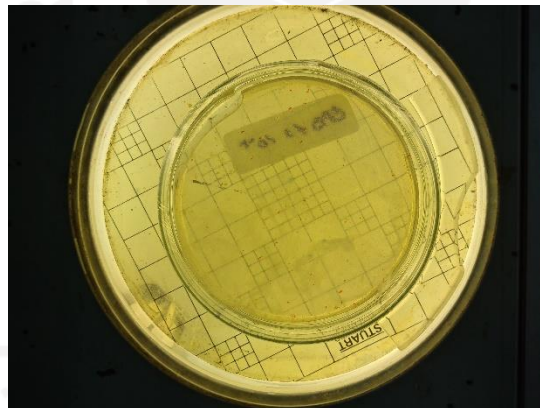
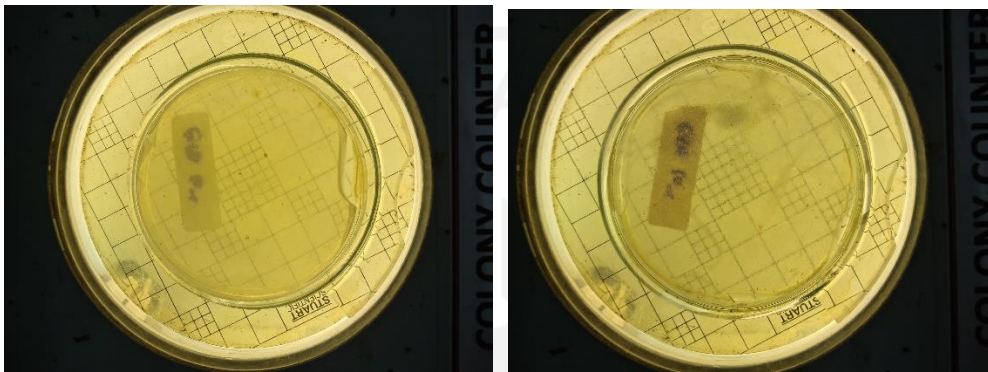
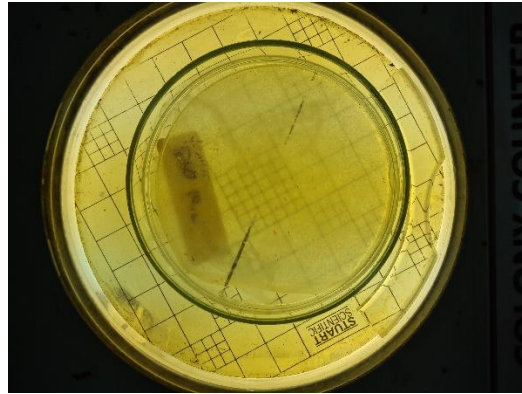




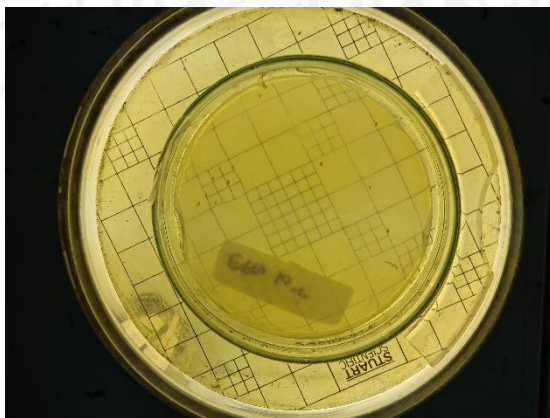
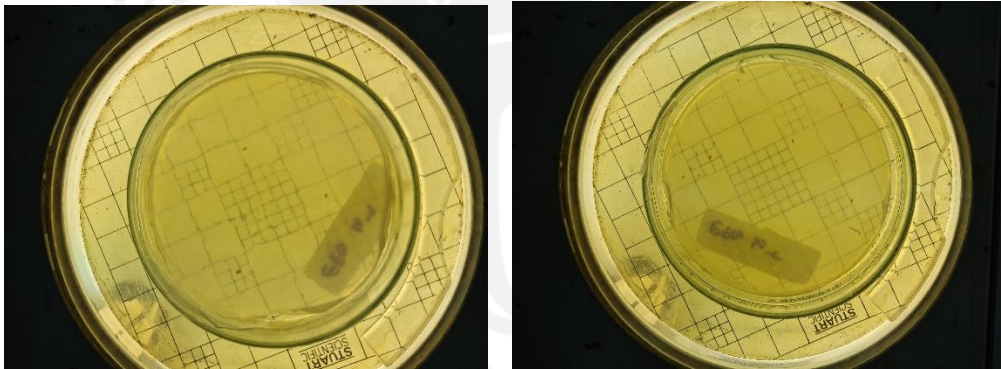
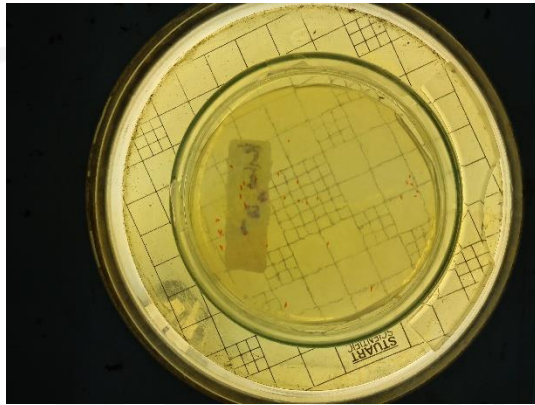
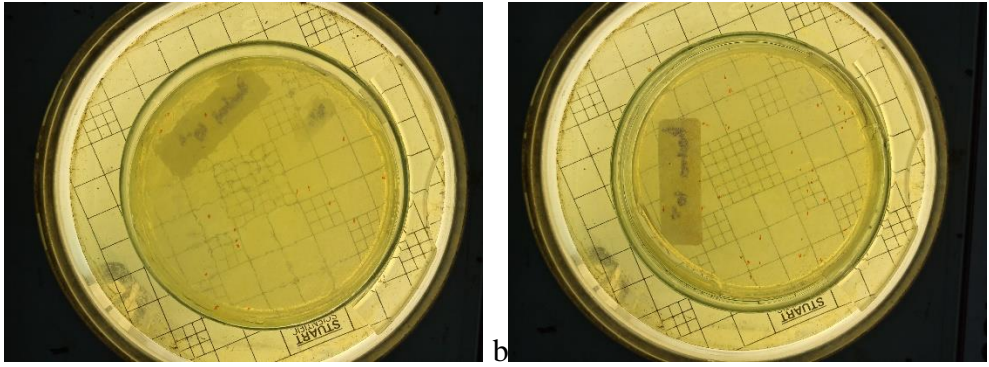


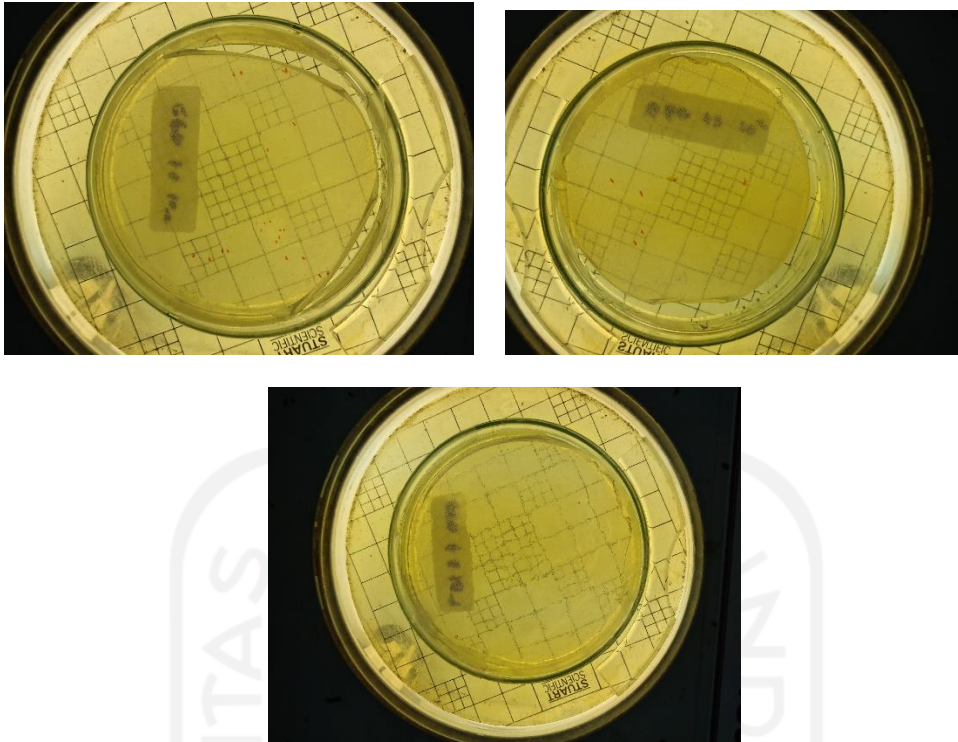
Lampiran 5 Hasil isolasi bakteri hari 12 pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+S





Lampiran 6 Hasil isolasi bakteri hari 24 pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+S





Lampiran 7 Hasil isolasi bakteri hari 48 pada reaktor kontrol, reaktor EFB dan reaktor EFB+S

