

No. TESIS: 051/S2-TL/0624

**EKSPLORASI DAN IDENTIFIKASI *COMAMMOX* PADA
SEDIMEN DI SISTEM BUATAN KOTA PADANG**



**PROGRAM STUDI MAGISTER TEKNIK LINGKUNGAN
FAKULTAS TEKNIK – UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2024**

**EKSPLORASI DAN IDENTIFIKASI COMAMMOX PADA
SEDIMEN DI SISTEM BUATAN KOTA PADANG**

TESIS

Sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan
Program strata-2 pada
Program Studi Magister Teknik Lingkungan Fakultas Teknik Universitas Andalas



Oleh:

SODAYA UMMI

2220942006

Pembimbing:

Dr. Eng. ZULKARNAINI

Prof. SHINTA INDAH, Ph. D

**PROGRAM STUDI MAGISTER TEKNIK LINGKUNGAN
FAKULTAS TEKNIK – UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG**

2024

LEMBAR PENGESAHAN

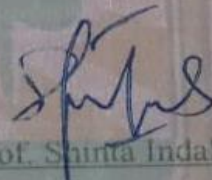
**EKSPLORASI DAN IDENTIFIKASI *COMAMMOX* PADA
SEDIMEN DI SISTEM BUATAN KOTA PADANG**

Lulus Sidang Tesis tanggal: 12 Juni 2024

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



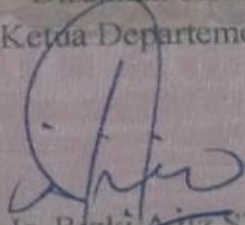
Dr. Eng. Zulkarnaini

Prof. Shinta Indah, Ph. D

NIP. 198004212009121003

NIP. 197301081999032002

Disahkan oleh:
Ketua Departemen,

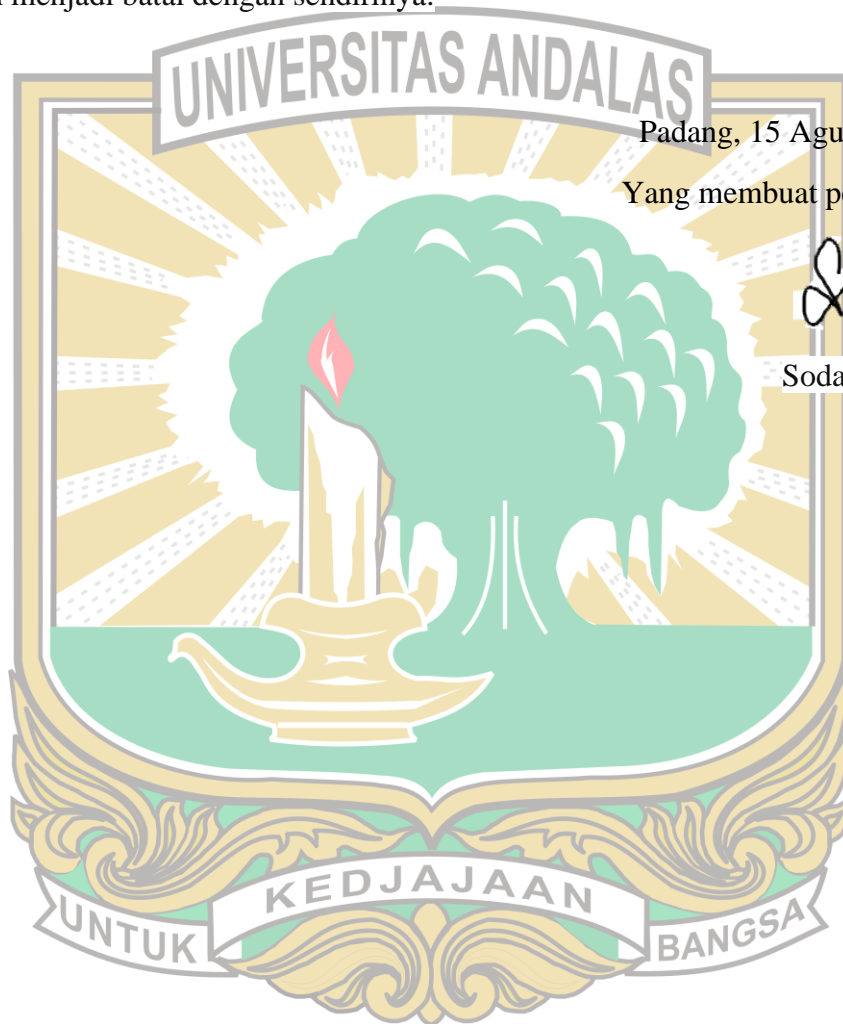


Dr. Ir. Rizki Aziz ST. MT

NIP. 197610312005011001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang ditulis dengan judul “Eksplorasi dan Identifikasi *Comammox* pada Sedimen di Sistem Buatan Kota Padang” adalah benar hasil kerja/karya saya sendiri dan bukan merupakan hasil tiruan kerja/karya orang lain, kecuali kutipan pustaka yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang akan saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.



Padang, 15 Agustus 2024

Yang membuat pernyataan

Sodaya Umami

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis dengan judul **Eksplorasi dan Identifikasi *Comammox* pada Sedimen di Sistem Buatan Kota Padang** dengan baik. Penulisan Tesis ini dimaksudkan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar magister pada Departemen Teknik Lingkungan Universitas Andalas. Penyelesaian Tesis ini tidak lepas dari bantuan dan dorongan dari banyak pihak. Untuk itu pada kesempatan ini, dengan segala kerendahan hati penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua orang tua yang selalu memberikan doa-doa serta dorongan semangat yang tiada henti, serta seluruh keluarga yang selama ini memberikan semangat dan motivasi untuk keberhasilan penulis.
2. Bapak Dr. Eng Zulkarnaini dan Ibu Prof. Shinta Indah Ph.D, selaku dosen pembimbing sekaligus motivator yang telah memberikan bimbingan, wawasan, dukungan, nasihat, waktu dan doa yang sangat berarti bagi penulis dalam menyelesaikan Tesis ini.
3. Ibu Dr. Eng Shinta Silvia selaku pembimbing akademik yang telah membantu dan memberikan arahan kepada penulis selama menjalani proses akademik hingga sampai pada tahapan Tesis ini.
4. Bapak Dr. Rizki Aziz selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan kepada Penulis.
5. Bapak Prof. Denny Helard Ph.D, selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan kepada Penulis.
6. Ibu Dr. Eng Shinta Silvia selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan kepada Penulis.
7. Ibu Syofni, S.Si selaku Analis Laboratorium Air di Departemen Teknik Lingkungan yang telah memberikan bantuan, dukungan, arahan dan semangat dalam pengerjaan Tesis ini.
8. Bapak dan Ibu staf pengajar beserta karyawan Departemen Teknik Lingkungan Universitas Andalas yang telah memberikan ilmu dan bantuan kepada penulis.

9. Rekan kerja seperjuangan Tim *Comammox* yang saling membantu dan menyemangati selama pengerjaan Tesis
10. Keluarga besar angkatan magister 2022 yang selalu memberikan semangat dan dukungan kepada penulis dalam penyelesaian Tesis ini.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang turut membantu penulis dalam menyelesaikan Tesis ini.

Akhirnya penulis menyadari sepenuhnya kekurangan yang ada pada diri penulis. Penulis menerima segala bentuk kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaan laporan ini dan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga Tesis ini dapat berguna dan memperkaya wawasan bagi pembaca.

Padang, 15 Agustus 2024

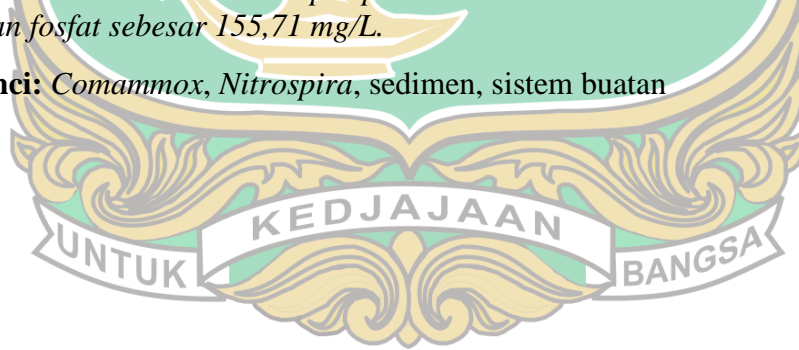
Penulis



ABSTRAK

Nitrifikasi merupakan proses oksidasi amonia menjadi nitrat melalui nitrit. Proses ini dapat dipersingkat dengan proses complete ammonia oxidation (comammox) dengan bakteri genus *Nitrospira* yang melakukan oksidasi amonia menjadi nitrat dalam satu organisme tunggal. Karakteristik yang berbeda dari bakteri comammox di berbagai ekosistem menunjukkan bahwa bakteri tersebut mungkin dapat beradaptasi pada kondisi lingkungan yang beragam dan spesifik. Penelitian mengenai bakteri comammox tergolong baru dan masih belum banyak dieksplorasi, terutama di Indonesia, Khususnya Sumatra Barat, Kota Padang. Kelimpahan bakteri comammox dihitung berdasarkan lima sampel sedimen yang diambil dari sistem buatan yang terdapat di Kota Padang, Sumatra Barat. Parameter lingkungan yang diukur yaitu suhu, pH, DO, dan salinitas, sedangkan pada sedimen yaitu pH, TOC, amonium, nitrat, nitrit, fosfat, dan sulfat. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi dan mengidentifikasi parameter fisikokimia lingkungan air limbah serta comammox pada sistem buatan yang berbeda, yaitu Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Pabrik Karet, saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu, IPAL Rumah Sakit Pendidikan (RSP) Universitas Andalas, Instalasi Pengolahan Lumpur Tinja (IPLT), dan Instalasi Pengolahan Lindi (IPL) Tempat Pemrosesan Akhir (TPA) Air Dingin yang berada di Kota Padang. Parameter fisikokimia lingkungan air limbah yang dianalisis yaitu TOC (1,59 %-15,14 %), pH (5,1-5,8), amonium (10,95 mg/L-51,79 mg/L), nitrit (0,63 mg/L-153,58 mg/L), nitrat (19,28 mg/L-50,01 mg/L), fosfat (58,12 mg/L-220,20 mg/L) serta sulfat (19,19 mg/L-43,38 mg/L). Analisis komunitas comammox menggunakan Illumina Miseq Sequencing. Bakteri comammox yang teridentifikasi adalah *Candidatus Nitrospira nitrosa* sebesar 0,245% pada IPAL Pabrik Karet, sedangkan pada lokasi sampling lainnya tidak ditemukan. Berdasarkan penelitian ini keberadaan comammox terdapat pada sistem buatan di kota Padang dengan kandungan fosfat sebesar 155,71 mg/L.

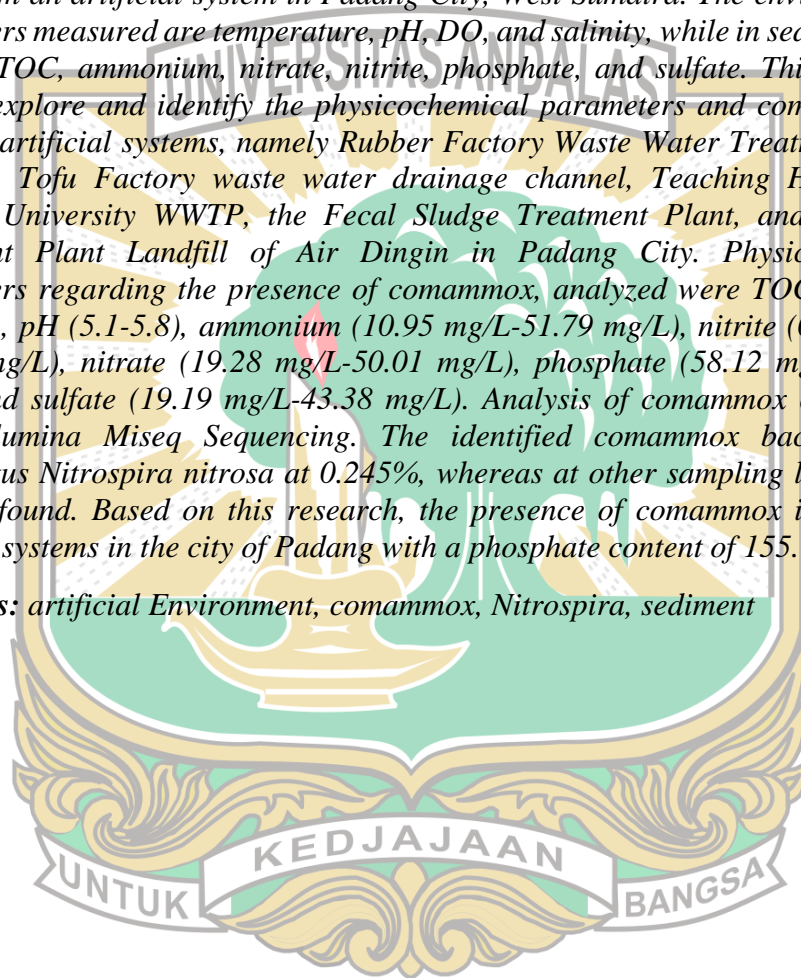
Kata kunci: Comammox, *Nitrospira*, sedimen, sistem buatan



ABSTRACT

The process of nitrification, oxidation of ammonia to nitrate via nitrite, can be shortened to the complete ammonia oxidation (comammox) process with bacteria of the genus *Nitrospira* which oxidize ammonia to nitrate in a single organism. The different characteristics of comammox bacteria in various ecosystems suggest that they may be able to adapt to diverse and specific environmental conditions. Research on comammox bacteria is relatively new and has not yet been widely explored, especially in Indonesia, especially West Sumatra, Padang City. The abundance of comammox bacteria was calculated based on five sediment samples taken from an artificial system in Padang City, West Sumatra. The environmental parameters measured are temperature, pH, DO, and salinity, while in sediment they are pH, TOC, ammonium, nitrate, nitrite, phosphate, and sulfate. This research aims to explore and identify the physicochemical parameters and comammox in different artificial systems, namely Rubber Factory Waste Water Treatment Plant (WWTP), Tofu Factory waste water drainage channel, Teaching Hospital of Andalas University WWTP, the Fecal Sludge Treatment Plant, and Leachate Treatment Plant Landfill of Air Dingin in Padang City. Physicochemical parameters regarding the presence of comammox, analyzed were TOC (1.59 %-15.14 %), pH (5.1-5.8), ammonium (10.95 mg/L-51.79 mg/L), nitrite (0.63 mg/L-153.58 mg/L), nitrate (19.28 mg/L-50.01 mg/L), phosphate (58.12 mg/L-220.20 mg/L) and sulfate (19.19 mg/L-43.38 mg/L). Analysis of comammox community using Illumina Miseq Sequencing. The identified comammox bacteria was *Candidatus Nitrospira nitrosa* at 0.245%, whereas at other sampling locations it was not found. Based on this research, the presence of comammox is found in artificial systems in the city of Padang with a phosphate content of 155.71 mg/L.

Keywords: artificial Environment, comammox, *Nitrospira*, sediment



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	ii
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	v
<i>ABSTRACT</i>	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Maksud dan Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	3
1.4 Ruang Lingkup	3
1.5 Sistematika Penulisan	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Complete Ammonia Oxidation (Comammox)</i>	5
2.1.1 Amonia	7
2.1.2 Siklus Nitrogen	10
2.1.3 Nitrifikasi	10
2.2 Hakikat Lingkungan	13
2.2.1 Lingkungan Alami	14
2.2.2 Sistem Buatan	15
2.3 Identifikasi <i>Comammox</i>	15
2.3.1 Ekstraksi DNA	15
2.3.2 <i>Next Generation Sequencing (NGS)</i>	16
2.3.3 <i>The Illumina Sequencing Method</i>	16
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	22
3.1 Umum	22
3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	22
3.3 Tahap Penelitian	22
3.3.1 Studi Literatur	24

3.3.2	Persiapan Sebelum Sampling	24
3.3.3	Pengukuran Parameter Lingkungan Kualitas Air	24
3.3.4	Pengambilan Sampel	25
3.3.5	Persiapan Analisis Parameter Lingkungan	30
3.3.5.1	Alat dan Bahan	30
3.3.5.2	Pengeringan Sampel Sedimen	31
3.3.5.3	Pengayakan Sampel Sedimen Kering	31
3.3.5.4	Penyimpanan Sampel Sedimen	31
3.3.6	Analisis Parameter Fisikokimia	31
3.3.7	Metode Analisis Mikrobiologi dengan <i>Illumina Miseq Sequencing</i>	32
3.3.8	Analisis Filogeni	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		35
4.1	Umum	35
4.2	Parameter Lingkungan	35
4.2.1	Analisis Parameter Fisikokimia Air Limbah pada Lokasi Sampling	35
4.3	Analisis Komunitas Mikrob	46
4.4	Analisis Parameter Fisikokimia yang terkait dengan <i>Comammox</i>	53
4.5	Faktor Lingkungan Utama yang memengaruhi Kelimpahan Bakteri <i>Comammox</i>	57
4.6	Penyebaran Populasi dan Komunitas <i>Comammox Nitrospira</i>	60
4.7	Kontribusi Penemuan Bakteri <i>Comammox Nitrospira</i> terhadap Lingkungan Buatan	61
BAB V PENUTUP		65
5.1	Kesimpulan	65
5.2	Saran	65
DAFTAR PUSTAKA		66
LAMPIRAN		84

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Proses <i>Comammox</i>	7
Gambar 2.2	Skema Sederhana Proses <i>Illumina Miseq Sequencing</i>	18
Gambar 3.1	Diagram Alir Metodologi Penelitian	23
Gambar 3.2	Plot Pengambilan Sampel Sedimen.....	26
Gambar 3.3	Peta Lokasi Pengambilan Sampel	27
Gambar 4.1	Hasil Analisis Parameter pH Sedimen	38
Gambar 4.2	Kandungan TOC Sedimen.....	39
Gambar 4.3	Kandungan Amonium Sedimen	40
Gambar 4.4	Kandungan Fosfat Sedimen.....	41
Gambar 4.5	Kandungan Nitrit Sedimen	43
Gambar 4.6	Kandungan Nitrat Sedimen	44
Gambar 4.7	Kandungan Sulfat Sedimen	45
Gambar 4.8	Kelimpahan Relatif Total Mikrob pada Tingkat Filum. Kelimpahan yang <1% digabung ke dalam lainnya	47
Gambar 4.9	Kelimpahan Relatif Total Mikrob pada Tingkat Genus. Kelimpahan yang <1% digabung ke dalam lainnya, a. S1, b. S2, c. S3, d. S4, e. S5	49
Gambar 4.10	Kelimpahan Relatif Genus <i>Nitrospira</i>	49
Gambar 4.11	Pohon Filogeni dari Sekuen <i>Comammox Nitrospira</i> pada sampel sedimen.....	51
Gambar 4.12	Persentase <i>Candidatus Nitrospira Nitrosa</i>	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Penelitian Terdahulu tentang <i>Comammox</i>	19
Tabel 3.1 Lokasi dan Waktu Pengambilan Sampel	25
Tabel 3.2 Lokasi dan Titik Pengambilan Sampel	28
Tabel 3.3 Alat dan Bahan yang Digunakan	30
Tabel 3.4 Metode Analisis	32
Tabel 4.1 Analisis Karakteristik Parameter Fisikokimia Air Limbah pada Lokasi Sampling.....	35
Tabel 4.2 Persentase Kelimpahan Sampel	52
Tabel 4.3 Lokasi Penemuan <i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i>	53
Tabel 4.4 Hasil Analisis Parameter Fisikokimia yang terkait dengan Kelimpahan <i>Comammox</i>	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Analisis Mikrobiologi	84
Lampiran 2 Analisis Parameter Lingkungan.....	93
Lampiran 3 Hasil Analisis Mikrob	106
Lampiran 4 Parameter Lapangan	118
Lampiran 5 Data Lengkap Hasil Pengukuran	119
Lampiran 6 Dokumentasi	122



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Nitrifikasi merupakan langkah penting dalam siklus nitrogen global serta memainkan peran penting baik dalam lingkungan alami maupun sistem rekayasa, termasuk Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) (Sobotka et al., 2018). Nitrifikasi terdiri dari dua tahap yaitu oksidasi amonia (NH_3) menjadi nitrat (NO_3^-) melalui nitrit (NO_2^-) (Gallego et al., 2021). Tahapan pertama dalam nitrifikasi, yaitu oksidasi amonia oleh *ammonia-oxidizing bacteria* (AOB) dan *ammonia-oxidizing archaea* (AOA) menjadi nitrit (Zhao et al., 2019). Tahapan kedua, yaitu oksidasi nitrit oleh *nitrite-oxidizing bacteria* (NOB) menjadi nitrat. Baru-baru ini, telah ditemukan mikroorganisme tunggal yang dapat melakukan oksidasi lengkap terhadap amonia menjadi nitrat atau disebut juga dengan *complete ammonia oxidation* (*comammox*) atau pengoksidasi amonia lengkap (Mehrani et al., 2021).

Comammox ditemukan pertama kali pada akhir tahun 2015 (Daims et al., 2015; Van Kessel et al., 2015). Kata “*comammox*” berasal dari kemampuannya untuk melakukan oksidasi amonia lengkap hingga menjadi nitrat (NO_3^-). Metabolisme *comammox* mengubah persepsi mengenai nitrifikasi yang merupakan proses dua langkah yang memerlukan aktivitas terkoordinasi dari AOB atau AOA yang mengubah amonia (NH_3) menjadi nitrit (NO_2^-) serta NOB yang mengubah nitrit (NO_2^-) menjadi nitrat (NO_3^-). Kemampuan *comammox* untuk mengoksidasi amonium menjadi nitrat dapat bersaing dengan AOB/AOA dan NOB pada nitrifikasi konvensional (Lawson & Lückner, 2018). Komunitas *comammox* yang terdeteksi termasuk ke dalam genus *Nitrospira* (Roots et al., 2019a) dan dapat ditemukan di berbagai lingkungan alami seperti air tawar, sedimen, zona pasang surut, lumpur aktif, tanah hutan, dan sawah serta sistem buatan seperti IPAL (Gallego et al., 2021).

Hasil penelitian terbaru mengenai *comammox* pada lingkungan alami telah ditemukan oleh Gao et al. (2022) pada sawah, serta penelitian Liu et al. (2023) yang menemukan komunitas *comammox* pada sedimen sungai dan muara. Sedimen merupakan media lekat untuk pertumbuhan bagi bakteri *comammox*, dengan

kandungan nitrogen serta fosfat yang terdapat pada air limbah dapat dijadikan sebagai indikasi dari keberadaan mikroorganisme tertentu yang dibutuhkan untuk nutrisi dalam proses metabolisme (Liu et al., 2023).

Kondisi lingkungan seperti DO, pH, dan suhu mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan dan aktivitas bakteri *comammox* (Kits et al., 2017; Roots et al., 2019; Takahashi et al., 2020). Konsentrasi DO yang rendah membuat pertumbuhan *comammox* menjadi lebih tinggi karena oksidasi mikrob bakteri *comammox* mirip dengan oksidasi terminal tipe sitokrom bd, yang terjadi pada konsentrasi DO yang sangat rendah dan memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap DO (Borisov et al., 2011). Menurut Dimitri Kits et al. (2017) dan Sakoula et al. (2021) kelimpahan bakteri *comammox* berkaitan dengan amonium, dimana pada isolasi kultur murni bakteri *comammox* yang dilakukan menunjukkan bahwa afinitas amonia yang tinggi memperlambat pertumbuhan *comammox*, namun pada laju oksidasi amonium yang rendah, hasil pertumbuhan *comammox* menjadi lebih tinggi. Berdasarkan penelitian terdahulu, bakteri *comammox* yang ditemukan berada pada kondisi lingkungan DO yang relatif rendah dan TOC yang relatif rendah (Liu et al., 2020; Tang et al., 2023; Sun et al., 2020; Kits et al., 2017).

Hasil penelitian terdahulu pada lingkungan alami, Liu et al. (2020) menemukan adanya bakteri *comammox Nitrospira* pada sungai Yangtze di Cina yang sebesar 34-87% pada lingkungan oligotrofik dengan kondisi pH yang lebih tinggi dan suhu yang rendah. Hasil penelitian Sun et al. (2020) menjelaskan bahwa, *comammox* yang ditemukan pada muara di Cina yaitu berkisar antara $4,15 \times 10^5$ hingga $6,67 \times 10^6$ copies/g dengan rentang pH antara 6,74-8,65. Pada sistem buatan IPAL, komunitas *comammox* yang telah ditemukan oleh Pjevac et al. (2017) terdapat bakteri *comammox* sebanyak 43-71% dari total populasi genus *Nitrospira* yang berada di Wina Austria pada DO rendah, namun pada DO yang tinggi ($>3 \text{ mgO}_2/\text{L}$) kelimpahan *comammox* mengalami penurunan.

Walaupun keberadaan bakteri *comammox* ini telah dikonfirmasi pada tahun 2015, namun penemuan bakteri *comammox* pada sistem buatan serta karakteristik dari parameter fisikokimia yang terkait masih belum ada diteliti di Indonesia. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi dan

mengidentifikasi kelimpahan bakteri *comammox* pada sedimen sistem buatan di Indonesia khususnya Kota Padang Sumatra Barat serta parameter fisikokimia yang terkait, sehingga dapat digunakan untuk kultivasi bakteri *comammox* dan aplikasi pengolahan air limbah.

1.2 Maksud dan Tujuan

Maksud penelitian ini adalah menganalisis kelimpahan bakteri *comammox* pada sistem buatan di Kota Padang. Adapun tujuan penelitian tesis ini yaitu:

1. Menganalisis parameter fisikokimia meliputi TOC, pH, kandungan nitrogen, fosfat serta sulfat pada sedimen di sistem buatan meliputi Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL), Instalasi Pengolahan Lumpur Tinja (IPLT) dan Instalasi Pengolahan Lindi (IPL) di Tempat Pemrosesan Akhir (TPA) sampah di Kota Padang;
2. Mengidentifikasi *comammox* pada sistem buatan di Kota Padang dengan metode *next generation sequencing* (NGS) menggunakan *Illumina Miseq sequencing*;

1.3 Manfaat Penelitian Tesis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada berbagai pihak, yaitu:

1. Menjadi salah satu referensi bagi peneliti selanjutnya dalam mengidentifikasi keberadaan *comammox* di Indonesia;
2. Sebagai penelitian awal untuk kultivasi bakteri *comammox* dan aplikasi pada pengolahan air limbah.

1.4 Ruang Lingkup

Ruang lingkup dari penelitian ini adalah:

1. Pengujian dilakukan pada sampel sedimen pada unit yang berbeda di sistem buatan antara lain: IPL TPA, saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu, IPAL Pabrik Karet, IPAL Rumah Sakit Pendidikan Universitas Andalas, serta IPLT yang terdapat di kota Padang;
2. Parameter yang diamati yaitu TOC, pH, kandungan nitrogen, fosfat, dan sulfat serta jumlah komunitas mikroba pada sedimen;

3. Parameter lingkungan air limbah yang diamati yaitu pH, DO, suhu, dan Salinitas;
4. Identifikasi *comammox* dengan metode *next generation sequencing* (NGS) dengan alat *Illumina Miseq sequencing* di *Kanazawa University*, Jepang;

1.5 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan uraian tesis ini adalah:

BAB I PENDAHULUAN

Bab ini berisikan latar belakang, maksud dan tujuan penelitian, manfaat penelitian, Batasan masalah penelitian dan sistematika penulisan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini berisikan tentang landasan teori mengenai senyawa nitrogen, proses *comammox*, ekstraksi DNA, PCR dan *Illumina Miseq sequencing* dan lain-lain.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

Bab ini menjelaskan lokasi dan waktu penelitian, tahapan penelitian yang dilakukan seperti persiapan bakteri, ekstraksi DNA, PCR, bioanalisis, *Illumina Miseq sequencing* dan analisis filogeni.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini berisikan hasil pengujian laboratorium, pengolahan data dan pembahasan.

BAB V PENUTUP

Bab ini berisikan kesimpulan dan saran berdasarkan pembahasan yang telah diuraikan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Complete Ammonia Oxidation (Comammox)*

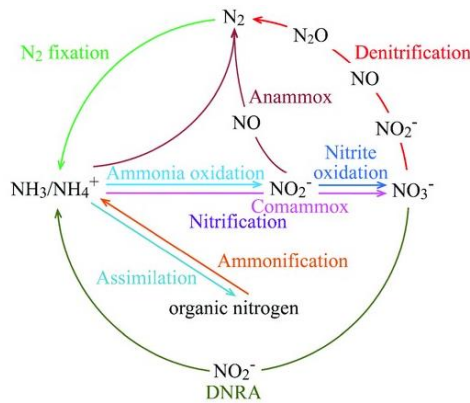
Comammox merupakan proses mengubah amonia secara langsung menjadi nitrat oleh mikroorganisme tunggal. Bakteri yang termasuk dalam *comammox* disebut dengan *comammox Nitrospira*. Dibandingkan dengan NOB, *comammox Nitrospira* memiliki gen yang terkait dengan oksidasi amonia dan oksidasi nitrit (Lawson & Lücker, 2018). Jalur metabolisme yang unik ini membuat bakteri *comammox* berbeda dengan bakteri dalam proses nitrifikasi lainnya (Mehrani et al., 2021).

Terdapat bukti bahwa bakteri *comammox* tidak dapat bersaing dengan agen nitrifikasi lainnya seperti AOB, NOB dalam sistem pengolahan air. Sebaliknya, *comammox Nitrospira* ditemukan dominan dalam sistem nitrifikasi lumpur aktif dibandingkan dengan AOB dan NOB (Sun et al., 2020a). Kondisi yang berpotensi menguntungkan untuk pertumbuhan *comammox Nitrospira* adalah tingkat *dissolved oxygen* (DO) atau oksigen terlarut dan amonia yang rendah pada lingkungan terbatas nitrit. Persaingan antara AOB dan mikroorganisme *comammox* untuk amonia ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) dapat memainkan peran penting dalam mencapai nitrifikasi parsial (nitrifikasi) yang diperlukan untuk proses penyisihan nitrit. Model simulasi adalah alat manajemen penting dalam operasi pengolahan air dan membantu memahami interaksi mikrob yang kompleks dalam sistem pengolahan air biologi. Berdasarkan teori terdahulu, seluruh jalur nitrifikasi, yaitu oksidasi amonia menjadi nitrat, secara konvensional dimodelkan sebagai proses satu langkah, dengan asumsi bahwa langkah pertama (oksidasi amonia menjadi nitrit) biasanya merupakan konversi pembatas laju selama oksidasi. Model nitrifikasi dua fase telah dikenal selama hampir 60 tahun dan masih dikembangkan lebih lanjut (Kessel et al., 2015).

Nitrifikasi memainkan peran penting dalam siklus nitrogen biogeokimia. Sejak penemuannya pada tahun 1890-an, proses nitrifikasi yang diterima secara umum terdiri dari dua tahap, didukung oleh bakteri AOA/AOB; $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ dan NOB; $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$. Sebuah studi sebelumnya menunjukkan bahwa *comammox* atau oksidasi lengkap amonia menjadi nitrat dimungkinkan terjadi dalam satu organisme. Pada 2015, *comammox* pertama kali dikonfirmasi dalam urutan

metagenomik yaitu genus *Nitrospira* (Kessel et al., 2015). Semua bakteri *comammox* yang diketahui saat ini adalah *Nitrospira subclade II*, yang selanjutnya dibagi menjadi *clade A* (termasuk *subclade A1* dan *A2*) dan *clade B*. Distribusi *comammox* secara luas berada di ekosistem buatan dan alami, seperti ekosistem buatan, komunitas di dalam reaktor, tanah hutan, sedimen danau, tanah, dan rawa. Berdasarkan penelitian yang dilakukan pada reaktor percobaan skala laboratorium, didapatkan *comammox* sebesar $5,81 \times 10^8$ hingga $9,04 \times 10^9$ eksemplar g^{-1} , dan untuk kelimpahan bakteri *comammox* di ekosistem alami sebesar $1,84 \times 10^5$ hingga $3,19 \times 10^6$ eksemplar g^{-1} . Dibandingkan dengan ekosistem alami, sistem buatan selalu terkena polusi nitrogen yang tinggi (Yuan et al., 2021).

Nitrogen merupakan elemen penting bagi organisme hidup karena pada siklus nitrogen, bakteri memainkan peran penting dalam konversi senyawa nitrogen di suatu ekosistem. Dalam pertanian konvensional, senyawa nitrogen organik yang diaplikasikan ke tanah sebagai pupuk mengalami dekomposisi dan amonia selanjutnya dioksidasi oleh nitrit menjadi nitrat oleh mikroba, konversi biologi pertama disebut amonifikasi dan nitrifikasi kedua. Meskipun amonifikasi dapat dikatalisis oleh berbagai bakteri heterotrofik, nitrifikasi hanya dilakukan oleh beberapa spesies mikroba yang disebut nitrifier, yaitu AOB dan AOA serta NOB. Selain bakteri-bakteri tersebut, baru-baru ini ditemukan bakteri yang dapat mengubah amonia secara langsung menjadi nitrit yang disebut *comammox*. Karena banyak tanaman yang mengandung nitrogen dalam bentuk nitrat, maka pertumbuhannya sangat bergantung pada kemampuan mikroba pengubah nitrogen tersebut. Dalam pertanian hidroponik, penggunaan pupuk nitrogen organik terbukti dapat menghambat pertumbuhan tanaman karena kurangnya mineralisasi nitrogen mikroba dalam sistem (Kessel et al., 2015).



Gambar 2.1 Proses Comammox

Sumber: Dang, 2017

Reaksi umum untuk proses *comammox* dapat dilihat pada persamaan berikut:

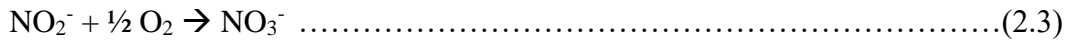
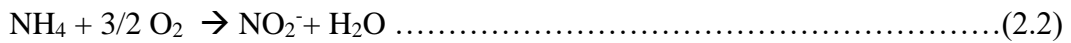


Dalam reaksi ini, satu molekul amonium (NH₄⁺) dan 1.5 molekul oksigen (O₂) bereaksi untuk menghasilkan satu molekul nitrat (NO₃⁻), air (H₂O), dan dua molekul ion hidrogen (H⁺). Dalam proses ini, oksigen digunakan sebagai penerima elektron untuk mengoksidasi amonium menjadi nitrat (Daims et al., 2015).

2.1.1 Amonia

Amonia merupakan senyawa yang banyak terdapat pada saluran pembuangan kotoran, limbah domestik dan limbah cair dari berbagai industri. Konsentrasi amonia yang tinggi dapat menyebabkan eutrofikasi di perairan umum, seperti sungai dan danau. Selain itu, proses oksidasi amonia yang memerlukan oksigen dalam jumlah besar dapat menyebabkan konsentrasi oksigen terlarut di dalam perairan menjadi rendah, dan kondisi seperti ini sangat berbahaya bagi organisme akuatik. Oleh karena itu proses degradasi senyawa nitrogen, utamanya amonia menjadi sangat penting dalam sistem pengolahan limbah cair. Secara umum diyakini bahwa degradasi amonia secara biologi, melalui proses nitrifikasi dan denitrifikasi dilihat dari efisiensi degradasinya dianggap paling ekonomis. Namun demikian, bakteri nitrifikasi yang bersifat autotrof sangat sensitif terhadap faktor lingkungan dan tumbuh sangat lambat sehingga populasinya di dalam lumpur aktif seringkali berkompetisi dengan mikroorganisme heterotrof. Mikrob nitrifikasi pada umumnya bersifat autotrof. Dalam proses nitrifikasi terjadi dua tahapan reaksi,

yaitu oksidasi amonium menjadi nitrit dan oksidasi nitrit menjadi nitrat. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Kelompok bakteri lainnya yang berperan dalam proses nitrifikasi adalah *Nitrobacteriaceae*, diantaranya adalah *Nitrosomonas* (bakteri pengoksidasi amonium) dan *Nitrobacter* (bakteri pengoksidasi nitrit). Beberapa mikroorganisme yang bersifat heterotrof juga dilaporkan mampu mengoksidasi amonia atau nitrogen organik menjadi nitrit atau nitrat. Bakteri nitrifikasi yang bersifat autotrof memperoleh energi untuk penyusunan, pengaturan sel, pertumbuhan dan aktivitasnya dari oksidasi senyawa nitrogen, terutama amonium. Bakteri nitrifikasi sangat sensitif terhadap substansi toksik, pH, suhu, oksigen, dan konsentrasi substrat. Adanya material organik juga berpengaruh negatif terhadap proses nitrifikasi (Agustiyani et al., 2010).

Amonia merupakan gas tidak berwarna yang menyebabkan iritasi dengan bau menyengat, mirip bau bahan atau cairan pembersih. Amonia dapat meracuni kehidupan perairan pada pH dan suhu tinggi. Terdapat 2 bentuk amonia pada perairan, yaitu gas amonia (NH_3) dan kation amonium (NH_4^+). Gas amonia yang tidak terionisasi dapat bereaksi dengan air, membentuk kation amonium. Keberadaannya dipengaruhi pH dan suhu, dimana keberadaan gas amonia dominan pada pH dan suhu lebih tinggi. Amonia dalam kadar tertentu dapat meningkatkan keasaman tanah dan mendorong pertumbuhan tanaman. Amonia juga dapat berperan sebagai zat hara yang mendorong pertumbuhan fitoplankton dan ikan. Kadar amonia berlebihan dapat menyebabkan eutrofikasi dan mengganggu kehidupan perairan. Amonia dapat membahayakan kehidupan perairan mulai dari konsentrasi 1 mg NH_3/L yang menyebabkan beberapa ikan kecil mati lemas. Gas amonia bersifat korosif dan menyerang mata secara cepat, menyebabkan cedera berat hingga menyebabkan kebutaan. Amonia pada kulit dapat menyebabkan iritasi dan luka bakar, tergantung tingkat paparannya (Agustiyani et al., 2010).

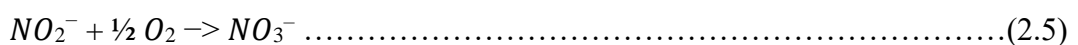
Kadar amonia mulai dari 0,2 mg/L menurunkan efisiensi desinfeksi pengolahan air minum, dimana klorin bereaksi dengan amonia dan butuh dosis klorin lebih tinggi untuk melakukan desinfeksi. Reaksi amonia dengan klorin membentuk produk

sampingan desinfeksi (*disinfection by products* atau DBP) yang dapat merusak sistem saraf manusia dan mengganggu rasa & bau air. Reaksi ini juga dapat membentuk kloramin bersifat karsinogenik. Monokloramin dapat menjadi disinfektan lemah pada sistem distribusi air, tetapi trikloramin terbentuk pada kondisi tertentu dan mengganggu rasa & bau air. Teknologi penyisihan amonia dalam pengolahan air dapat dilakukan dengan proses fisikokimia dan proses biologi. Secara umum, proses fisikokimia seperti klorinasi, pertukaran ion, filtrasi membran dan air *stripping* berperan sebagai metode umum penyisihan amonia dalam pengolahan air. Pada saat ini, proses biologi mulai menarik perhatian sebagai alternatif unit proses dalam pengolahan air limbah, terutama dalam aspek penyisihan amonia (Agustiyani et al., 2010).

Dalam proses biologi, mikroorganisme menyisihkan pencemar dengan reaksi oksidasi-reduksi. Lapisan biologi (biofilm) terbentuk pada media filter berupa pasir, antrasit, atau *granular activated carbon* (GAC), membentuk proses biofiltrasi. Proses ini melibatkan 3 mekanisme penyisihan, yaitu penyisihan fisik, adsorpsi, dan proses biologi. Penyisihan amonia secara biologi melibatkan proses nitrifikasi dan denitrifikasi dengan mikroorganisme pengoksidasi amonia berupa AOB, AOA, dan bakteri *comammox*. Proses nitrifikasi mengoksidasi amonia (NH₃) atau amonium (NH₄⁺) menjadi nitrit (NO₂⁻), lalu menjadi nitrat (NO₃⁻). Proses ini diawali dengan proses nitritasi, dimana amonium dioksidasi menjadi nitrit oleh mikroorganisme pengoksidasi amonium, seperti bakteri *Nitrosomonas*. Reaksi yang berjalan adalah (Hamonangan & Yuniarto, 2022):



Tahap selanjutnya adalah tahap nitrasi, dimana nitrit dioksidasi menjadi nitrat oleh bakteri pengoksidasi nitrit, seperti *Nitrobacter*. Reaksi yang terjadi adalah (Hamonangan & Yuniarto, 2022):



Proses denitrifikasi adalah proses reduksi nitrat dan nitrit menjadi gas nitrogen (N₂) serta nitrogen oksida (N₂O) oleh bakteri heterotrof fakultatif tanpa oksigen, seperti *Micrococcus*, *Pseudomonas*, dan lain-lain (Hamonangan & Yuniarto, 2022).

2.1.2 Siklus Nitrogen

Nitrogen merupakan unsur keempat yang paling melimpah dalam biomassa seluler pada atmosfer bumi. Pertukaran antara gas nitrogen (N_2) yang masih ada di atmosfer dan nitrogen reaktif (senyawa nitrogen yang mendukung, atau merupakan produk dari metabolisme dan pertumbuhan sel metabolisme dan pertumbuhan) sepenuhnya dikendalikan oleh aktivitas mikrob. Sebelum munculnya proses Haber-Bosch (fiksasi industri N_2 menjadi amonia, NH_3) pada tahun 1909, hampir semua nitrogen reaktif di biosfer dihasilkan dan di daur ulang oleh mikroorganisme (Stein & Klotz, 2016).

Meskipun proses Haber-Bosch telah meningkatkan produktivitas tanaman pertanian hingga empat kali lipat, pupuk kimia dan sumber nitrogen tetap antropogenik lainnya kini jauh melebihi kontribusi alami, yang menyebabkan degradasi lingkungan yang belum pernah terjadi sebelumnya. Pentingnya nitrogen bagi biosfer dan kehidupan seluler tidak dapat disangkal; namun, pengetahuan mendasar tentang mikroorganisme dan proses enzimatik yang mengubah nitrogen menjadi berbagai kondisi oksidasi masih belum lengkap (Stein & Klotz, 2016).

2.1.3 Nitrifikasi

Nitrifikasi merupakan suatu proses penting siklus nitrogen dalam pembentukan nitrit atau nitrat dari komponen nitrogen (amonia) yang berlangsung secara biologi ataupun kimia melalui reaksi oksidasi. Proses biologi dalam nitrifikasi memiliki dua tahapan yaitu oksidasi amonium menjadi nitrit (NO_2^-) dan oksidasi nitrit menjadi nitrat (NO_3^-) yang dilakukan oleh bakteri autotrof (Klotz & Stein, 2008).

Mikroorganisme utama yang terlibat dalam proses nitrifikasi yaitu AOB yang dapat mengoksidasi amonium menjadi nitrit, dan NOB yang melakukan oksidasi nitrit menjadi nitrat. Selain itu terdapat pula bakteri yang mampu untuk mengoksidasi amonia menjadi nitrit dan juga nitrat, yang dikenal sebagai *comammox*. Bakteri nitrifikasi, *Nitrobacteriaceae* diklasifikasikan sebagai kemolitotrof yang dapat mengoksidasi – mereduksi senyawa anorganik. Bakteri ini menggunakan amonia serta nitrit dalam memenuhi kebutuhan karbon mereka. Bakteri yang turut dalam mengoksidasi amonium pada AOB yaitu bakteri kemolitotrofik dari

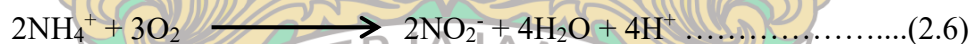
Betaproteobacteria, *Gammaproteobactia*, dan anggota *Thaumarchaeota* serta mikroorganisme heterotrof dan metanotrof, tanpa mendapatkan energi untuk mendukung pertumbuhan (Klotz & Stein, 2008).

Bakteri *comammox* termasuk ke dalam genus *Nitrospira* (Klotz & Stein, 2008). *Nitrospira sp* merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk seperti batang dan mampu mengonversi amonia dengan sangat efisien, namun tidak dapat mengubah amonia/nitrit tanpa adanya oksigen. Amonium dioksidasi menjadi nitrit oleh *Nitrosomonas*, dan nitrit dioksidasi menjadi nitrat oleh *Nitrobacter* untuk mendapatkan energi. Mikroorganisme *Nitrosomonas sp* dan *Nitrobacter sp* merupakan bakteri nitrifikasi primer.

Pada proses nitrifikasi, nitrit dan nitrat yang telah dihasilkan oleh reaksi aerob dapat dihilangkan secara anaerob yaitu dengan membentuk amonium asimilasi atau denitrifikasi (Stein & Klotz, 2016). Dalam proses nitrifikasi selain dapat menghasilkan nitrat, dapat pula menurunkan pH hingga sedikit asam yang akan meningkatkan kelarutan bahan organik lainnya (Ilma, 2021).

Proses nitrifikasi membutuhkan oksigen dan alkalinitas, dan sebagian nitrogen digunakan untuk sintesis biomassa. Proses denitrifikasi terjadi di bawah kondisi anoksik, mengonsumsi BOD dan menghasilkan sel baru. Reaksi dimana selama proses nitrifikasi-denitrifikasi terlihat sebagai berikut:

- Nitrifikasi



- Denitrifikasi



Nitrifikasi secara biologi adalah oksidasi ion amonium menjadi ion nitrit, serta ion nitrit menjadi ion nitrat. Selama proses oksidasi ion amonium dan ion nitrit, oksigen ditambahkan ke dalam ion-ion tersebut oleh bakteri nitrifikasi. Denitrifikasi dideskripsikan sebagai penggunaan ion nitrat atau ion nitrit oleh bakteri denitrifikasi (anaerob fakultatif) untuk mendegradasi BOD. Meskipun denitrifikasi sering dikombinasikan dengan aerob untuk menyisahkan variasi komponen nitrogen

dari limbah, namun denitrifikasi berlangsung ketika kondisi anoksik (tidak ada oksigen) (Setiawan & Hari, 2010).

Nitrifikasi adalah proses penting dalam konversi nitrogen (N) yang efektif di IPAL. Secara konvensional, proses tersebut diasumsikan terdiri dari dua langkah berturut-turut, termasuk oksidasi amonia menjadi nitrit oleh AOB, diikuti oleh oksidasi nitrit menjadi nitrat oleh NOB. Namun, proses *comammox* atau oksidasi amonia lengkap yang baru ditemukan telah mengubah dogma nitrifikasi dua langkah yang ketat (Kessel et al. 2015). *Comammox* adalah proses mengubah amonia langsung menjadi nitrat oleh mikroorganisme tunggal milik *Nitrospira*, selanjutnya disebut sebagai *comammox Nitrospira*. Dibandingkan dengan NOB, *comammox Nitrospira* memiliki gen yang terkait dengan oksidasi amonia dan oksidasi nitrit.

Jalur metabolisme unik ini membuat bakteri *comammox* berbeda dari nitrifikasi lainnya. Ada beberapa bukti bahwa bakteri *comammox* tidak mampu bersaing dengan nitrifier lain (AOB, NOB) dalam sistem pengolahan air limbah. Sebaliknya, *comammox Nitrospira* ditemukan dominan dibandingkan dengan AOB atau NOB dalam sistem nitrifikasi lumpur aktif (Sun et al., 2018). Kondisi yang berpotensi menguntungkan untuk pertumbuhan *comammox Nitrospira* terdiri dari konsentrasi DO dan amonia yang rendah atau lingkungan terbatas nitrit dengan *solid retention time* (SRT) atau waktu retensi padatan yang lama. Persaingan untuk amonia ($\text{NH}_4\text{-N}$) antara AOB kanonik dan mikroorganisme *comammox* dapat memainkan peran penting dalam mencapai nitrifikasi parsial (nitritasi), yang diperlukan dalam proses penyisihan N secara pintas, seperti “*shunt nitrit*” atau deamonifikasi (Kessel et al., 2015).

Faktor-faktor yang dapat memengaruhi persaingan antara organisme pengonversi N autotrofik, pada model nitrifikasi harus memperhitungkan persaingan antara AOB dan NOB secara memadai. Model nitrifikasi multi langkah juga mencakup jalur produksi N_2O yang dimediasi AOB melalui produksi *hidroksilamin* dan denitrifikasi autotrofik yang diterapkan pada optimalisasi dan simulasi *Chemical Oxygen Demand* (COD) dan p amonia dari *waste water treatment plant* (WWTP) (Wu et al., 2016).

Penyisihan nitrogen merupakan masalah mendesak dalam pengolahan air limbah, biasanya diwujudkan dengan kombinasi nitrifikasi dan denitrifikasi. Faktanya, nitrifikasi adalah proses yang lebih penting karena merupakan langkah pertama dalam penyisihan nitrogen dan melibatkan bakteri autotrof yang tumbuh lambat. Selain itu, bakteri nitrifikasi peka terhadap penghambatan zat organik yang resistan, di mana penghambatan tersebut memperlambat pertumbuhan nitrifikasi lebih lanjut. Karena banyak IPAL menerima limbah yang mengandung senyawa penghambat dari pabrik kimia atau farmasi, *input* limbah yang tidak diolah ini dapat menyebabkan kegagalan nitrifikasi dan penyisihan nitrogen sepenuhnya. Sulit untuk mengembalikan aktivitas nitrifikasi dengan cepat, karena nitrifikasi meningkat perlahan (H. Wang et al., 2017).

Bakteri *comammox* yang belum teridentifikasi dapat dibagi menjadi dua *clade* (A dan B) berdasarkan amonia monooksigenase filogenase. Skrining metagenomik dari sekuen gen *comammox amoA* berdasarkan database yang diberikan menunjukkan keberadaan *comammox Nitrospira* secara luas di beberapa habitat darat dan perairan (T. Liu et al., 2019).

Nitrogen amonia juga merupakan polutan air limbah yang ada di mana-mana dan diatur secara ketat. Ini terjadi dalam air dalam bentuk terionisasi (NH_4^+) dan tidak terionisasi (NH_3). Amonia dalam air menyebabkan eutrofikasi dan hujan asam ketika teroksidasi menjadi asam nitrat di atmosfer (Guillen-Burrieza et al., 2023).

2.2 Hakikat Lingkungan

Secara ilmiah, lingkungan merupakan segala sesuatu yang ada di bumi, meliputi air, tanah, udara dan seluruh makhluk hidup di dalamnya, serta adanya hubungan timbal balik antar komponen tersebut. Lingkungan ada yang terbentuk secara alami yang disebut dengan lingkungan alami, dan ada juga lingkungan yang sengaja dibuat oleh manusia yang disebut dengan sistem buatan. Kedua jenis lingkungan ini, sama-sama memiliki peranan yang sangat penting dalam kehidupan manusia. Terdapat beberapa faktor lingkungan seperti suhu, salinitas, pH, kecerahan, DO, dan nutrisi dapat berpengaruh terhadap kelimpahan mikroorganisme. Selain itu, faktor lingkungan seperti parameter fisika dan kimia, eksistensi organisme di suatu

lingkungan juga dapat dijadikan sebagai indikator terhadap pencemaran (Jhuma, 2016). Lingkungan hidup adalah seluruh kondisi eksternal dan pengaruhnya terhadap siklus perkembangan unsur-unsur biotik di permukaan bumi dan juga keadaan atau kondisi yang melingkupi organisme dan kelompoknya kondisi sosial atau budaya yang memengaruhi individu atau komunitas (Kumar, 2018).

Dengan demikian, lingkungan adalah keadaan total di mana suatu benda berada atau suatu tindakan terjadi, termasuk semua faktor fisik, kimia, biologis, fisiologis, dan psikologis. Istilah ini dapat dimodifikasi dan dibatasi dengan menentukan objek atau tindakan. Lingkungan terdekat adalah lingkungan yang langsung melingkupi objek atau tindakan; lingkungan yang terkena dampak total mencakup segala sesuatu, betapa pun kecilnya, yang dapat terpengaruh oleh objek atau tindakan (Jhuma, 2016).

2.2.1 Lingkungan Alami

Lingkungan alami merupakan semua makhluk hidup dan benda mati yang ada di bumi, dan terjadi secara alami tanpa ada campur tangan dari manusia (Johnson et al., 1997). Lingkungan alami juga dapat didefinisikan sebagai kondisi fisik dan biologis yang ada pada suatu daerah, termasuk bentang alam, iklim, tanah, air, tumbuhan dan hewan. Lingkungan ini juga mencakup hubungan antara elemen-elemen tersebut. Secara umum, lingkungan terbagi menjadi dua wilayah, yaitu lingkungan daratan dan lingkungan perairan. Contoh dari lingkungan alami ini yaitu sungai, danau, pantai, hutan, gunung dan pegunungan (Bird et al., 2018).

Lingkungan alam ini penting karena beberapa alasan, diantaranya sebagai penyedia kebutuhan dasar dalam kehidupan manusia, seperti air dan makanan. Hutan sebagai penyedia sumber makanan hewani dan nabati, serta keberadaan air dalam jumlah besar pada sungai dan danau dapat dimanfaatkan sebagai sumber penghasil energi, merupakan salah satu peranan penting dari lingkungan alami ini. Lingkungan alami juga memiliki peranan sebagai sarana hiburan dan rekreasi. Penciptaan lingkungan alami dengan berbagai bentuk dan bentangan yang indah akan menciptakan nuansa tenang bagi tubuh dan pikiran. Tidak kalah penting, lingkungan alami merupakan habitat asli dari berbagai jenis makhluk hidup, termasuk manusia, hewan, tumbuhan hingga mikroorganisme (Bird et al., 2018).

2.2.2 Sistem Buatan

Sistem buatan pertama kali muncul dari lingkungan alami sekitar 10.000 tahun yang lalu dengan munculnya pertanian (Bennett, 2019). Sistem buatan merupakan lingkungan yang keberadaannya secara sengaja dibuat oleh manusia. Pembuatan lingkungan ini bertujuan dalam pemenuhan kebutuhan manusia. Secara umum, sistem buatan terbagi menjadi dua yaitu sistem buatan yang berkaitan dengan alam, seperti waduk, sawah, bendungan dan perkebunan, serta sistem buatan yang berkaitan dengan bangunan, seperti perumahan, infrastruktur pengolahan air, jalan dan jembatan, serta sistem pengolahan air limbah seperti IPAL, IPLT, dan IPL TPA (Bird et al., 2018).

Pemenuhan kebutuhan manusia melalui sistem buatan dapat dilihat dari beberapa penerapan atau tujuan pembuatan lingkungan itu sendiri. Sawah sebagai media tumbuh padi merupakan salah satu contoh dari sistem buatan ini. Lingkungan sawah sengaja dibajak dan diairi untuk menjaga kelembapan tanahnya. Kondisi lingkungan yang sesuai dengan pertumbuhan padi akan disediakan, sehingga padi dapat tumbuh dengan baik (El-Omar, 2014).

2.3 Identifikasi Bakteri *Comammox*

2.3.1 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan proses pemisahan DNA dari komponen sel lainnya seperti protein, karbohidrat, lemak dan lain-lain. Ekstraksi DNA terdiri dari tiga tahap utama yakni perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari komponen lainnya serta pemurnian DNA. Pemecahan sel atau lisis pada proses ekstraksi sel bertujuan untuk menghancurkan membran dan dinding sel sehingga bagian dalam sel dapat keluar. Selanjutnya tahap pemisahan DNA dari makromolekul lain seperti protein, sebagian kecil RNA, lipid dan polisakarida. Tahap terakhir ialah pemurnian DNA. Tahap ini bertujuan untuk menghilangkan residu dari zat yang digunakan pada tahap lisis dan pemisahan DNA. Metode konvensional dalam ekstraksi DNA diantaranya adalah metode ekstraksi menggunakan *phenolchloroform*. Metode ini memerlukan sejumlah tahapan penambahan bahan-bahan kimia dan membutuhkan waktu pengerjaan yang cukup lama (± 18 jam). Seiring dengan berkembangnya

teknologi, proses ekstraksi DNA telah mengalami pengembangan dan modifikasi sehingga lebih efisien. Salah satu bentuk modifikasi proses ekstraksi DNA ialah penggunaan kit ekstraksi komersial yang telah berisi campuran bahan yang dibutuhkan untuk proses ekstraksi dengan waktu pengerjaan yang cukup singkat (± 2 jam) (Hutami et al., 2018).

2.3.2 Next Generation Sequencing (NGS)

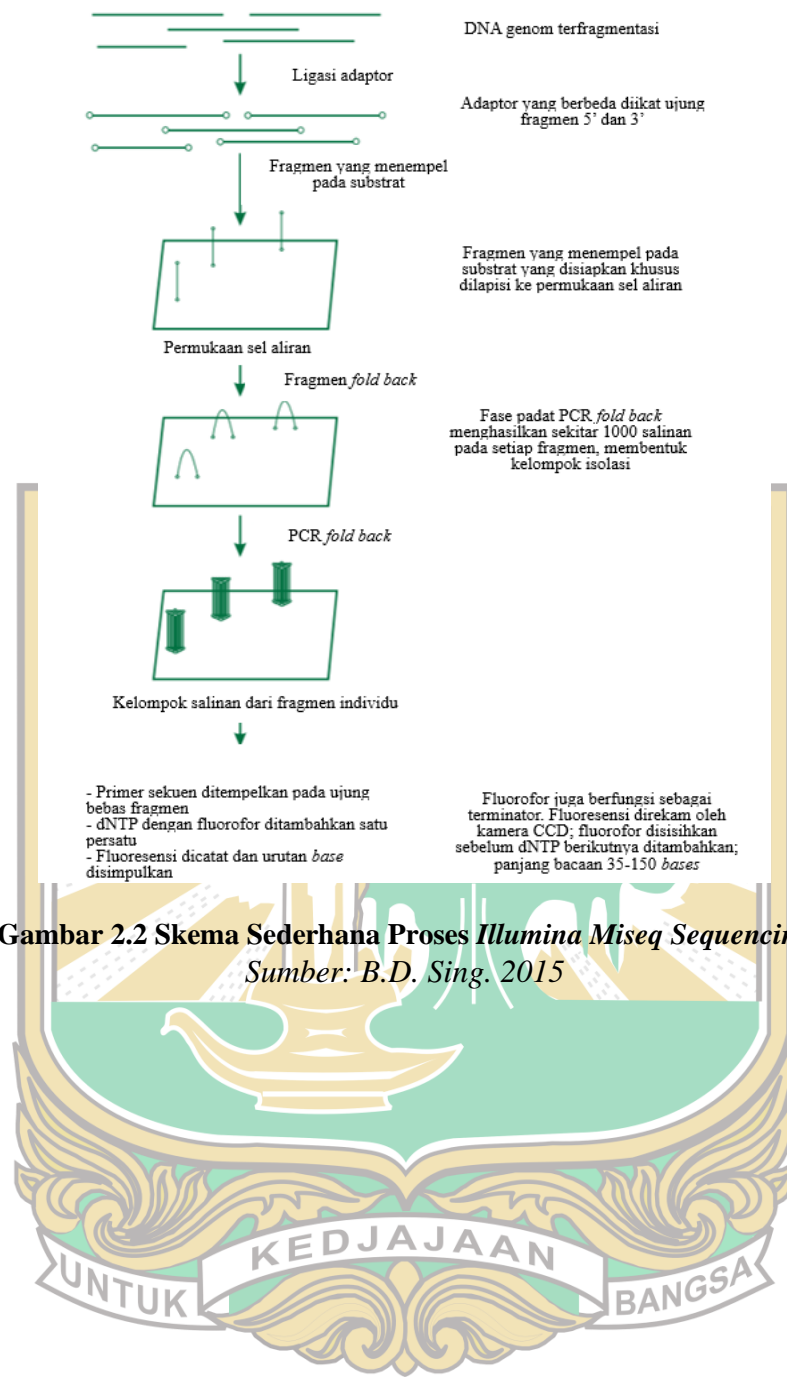
Metode pengurutan *Next Generation Sequencing* (NGS) juga disebut teknologi pengurutan paralel besar-besaran atau *massively parallel sequencing* (MPS), lebih cepat dan lebih murah serta membutuhkan persiapan *template* yang jauh lebih sedikit dibandingkan metode *Sanger-Coulson*. Metode NGS menggunakan amplifikasi PCR untuk persiapan *template* (persiapan perpustakaan *in vitro*), yang hanya membutuhkan waktu 2 jam, dan dapat menerima hasil yang sangat tinggi. Selanjutnya, mereka memungkinkan pengurutan simultan dari ratusan ribu hingga ratusan juta fragmen DNA yang berbeda. Saat ini terdapat lima metode NGS yaitu, (1) *454 sequencing*, (2) metode *Solexa*, (3) *ion semiconductor sequencing*, (4) metode *Polony*, dan (5) *massively parallel signature sequencing* (MPSS). Tiga metode pertama (*454*, *Solexa*, dan metode pengurutan semikonduktor ion) menggunakan sintesis DNA untuk pengurutan (pengurutan dengan sintesis, SBS), sedangkan metode *Polony* dan MPSS menggunakan hibridisasi *oligonukleotida* ke *templete* diikuti dengan ligasi ke rantai yang sedang tumbuh. MPSS cocok untuk kuantifikasi ekspresi gen; metode ini menggunakan beberapa siklus pembelahan dan ligasi enzimatis untuk menentukan urutan "*signature*" dari ujung molekul cDNA untuk membedakan dan mengukur berbagai spesies RNA yang ada dalam sampel (Singh & Singh, 2015).

2.3.3 The Illumina Sequencing Method

Teknologi NGS *Solexa* dikomersialkan oleh Amerika Serikat pada tahun 2007 yang merupakan teknologi NGS yang paling banyak digunakan. Platform terbaru dari seri ini adalah *Illumina Genome Analyzer* 1 Gb dan *HiSeq* 600 Gb. Sampel DNA terfragmentasi, dan dua adaptor yang berbeda diikat ke ujung 50 dan 30. Fragmen-fragmen tersebut dilekatkan pada substrat yang disiapkan secara khusus pada sel aliran, yang berisi primer yang padat untuk digunakan pada langkah selanjutnya

dari PCR fase padat. *Fold-back* PCR atau *bridge* PCR menghasilkan hingga 1.000 salinan identik dari setiap fragmen DNA. Semua salinan dari satu fragmen membentuk kelompok molekul yang terisolasi pada sel aliran, dan bersama-sama mereka mewakili klon *in vitro* dari fragmen tersebut. Semua kluster yang terbentuk pada sel aliran bersama-sama mewakili perpustakaan *in vitro*. Primer pengurutan sekarang melekat pada ujung fragmen yang bebas. Keempat dNTP yang digunakan untuk sintesis DNA memiliki *fluorofor* yang terkait dengannya; *fluorophores* ini juga berfungsi sebagai terminator rantai. dNTP ditambahkan satu per satu, dan kamera CCD merekam penggabungannya di ujung 3' primer sekuensing/rantai penumbuhan sebagai fluoresensi dari fluorofor yang melekat padanya. Terminator fluorofor dihilangkan dari dNTP yang baru saja ditambahkan ke rantai primer/tumbuh, membuat nukleotida ini tersedia untuk sintesis DNA lebih lanjut. Sebuah dNTP baru sekarang ditambahkan ke dalam campuran reaksi, itu digabungkan di ujung rantai yang tumbuh, fluoresensi dicatat, dan kemudian fluorofor dihilangkan. Dengan cara ini, urutan setiap fragmen DNA ditentukan. Penggunaan terminator rantai fluorofor yang terhubung ke dNTP menghilangkan kesalahan dalam penentuan urutan basa ketika basa yang sama hadir pada dua atau lebih posisi berurutan dalam untai cetakan (Singh & Singh, 2015).

Panjang baca dengan metode ini berkisar antara 35 hingga 150 basis, dan akurasi lebih besar dari 98,5%. Total pembacaan bebas kesalahan yang diberikan oleh *Illumina HiSeq 2000* adalah lebih dari 400 Gb dalam sekali proses, yang membutuhkan waktu 7–8 hari. Sistem *MiSeq* dan *HiSeq 2500* menghasilkan panjang baca hingga 250 bp dan telah meningkatkan pengambilan data dan fleksibilitas yang lebih besar. Sistem *Illumina* dapat digunakan untuk pengurutan *genom de novo*; *resequencing genom* untuk analisis SNP, InDels, variasi nomor salinan (CNV), dan variasi struktural; profil transkrip; dll. Namun, langkah amplifikasi PCR menimbulkan tingkat kesalahan yang tinggi. Sifat fluoresen keempat zat warna yang digunakan dalam metode ini cenderung menghasilkan substitusi A untuk C, G untuk T, dan sebaliknya pada data sekuen (Singh & Singh, 2015). Berikut skema metode *Illumina sequencing* pada **Gambar 2.2**.



Gambar 2.2 Skema Sederhana Proses Illumina MiSeq Sequencing
 Sumber: B.D. Sing. 2015

Tabel 2.1 Penelitian Terdahulu tentang *Comammox*

No.	Sampel dan Lokasi	Parameter	Spesies yang Ditemukan	Hasil Penelitian	Referensi
1	Sepanjang lahan basah muara di China (Liaohe, Beidaihe, Haihe, Yellow River, Sheyanghe, Bingchayunhe, Yangtze River, Jiaojiang, Oujiang, Minjiang, Mulanxi, Jiulongjiang, Yifuxi, Zhujiang, Yangjiang, dan Nanliujiang)	Salinitas pH Amonium Nitrit	Bakteri <i>comammox</i> yang terdeteksi adalah <i>Candidatus Nitrospira inopinata</i>	- pH berkorelasi positif dengan kelimpahan <i>comammox</i> - salinitas, amonium dan nitrit berkorelasi negatif dengan kelimpahan <i>comammox</i>	(Sun et al., 2020a)
2	Sawah di Shaoguan dan Antu, lahan gandum dan padang rumput Qianghai-Tibet Plateau, hutan Riparian, serta danau Chaohu, China	Amonium TC Nitrit	Bakteri <i>comammox</i> yang terdeteksi adalah <i>Candidatus Nitrospira nitrificans</i>	- Amonium dan nitrit berkorelasi positif dengan kelimpahan <i>comammox</i> - TC berkorelasi negatif dengan kelimpahan <i>comammox</i>	(Shi et al., 2020)
3	Sedimen dari 5 kawasan Danau Tangxun, Tiongkok yang meliputi kawasan kastanye air, Kawasan Teratai, Kawasan sedimen, Kawasan pembuangan limbah makanan, dan pembuangan limbah industri	Fosfat Amonium Nitrat Nitrit TN pH COD	Bakteri <i>comammox</i> yang terdeteksi adalah <i>Candidatus Nitrospira nitrificans</i> , <i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i> , dan <i>Candidatus Nitrospira inopinata</i>	- TN dan nitrit berkorelasi positif dengan kelimpahan <i>comammox</i> - Fosfat, amonium, nitrat, pH, dan COD tidak berkorelasi dengan <i>comammox</i>	(Xu et al., 2020)
4	Air permukaan di 10 stasiun hidrologi nasional, Yi Bin hingga Xu Liu Jing	pH TN Fosfat Amonium	Bakteri <i>comammox</i> yang terdeteksi adalah <i>comammox</i> clade A (<i>Candidatus Nitrospira inopinata</i> , <i>Candidatus Nitrospira nitrificans</i> dan <i>Candidatus Nitrospira</i>	- pH berkorelasi positif dengan kelimpahan <i>comammox</i> - TN, fosfat dan amonium berkorelasi negatif dengan kelimpahan <i>comammox</i>	(S. Liu et al., 2021)

			<i>nitrosa</i>), clade B (uncultured) dan <i>comammox</i> tidak terklasifikasi		
5	Tanah pesisir Pantai, danau, kampus, taman, area perumahan dan jalan raya	Amonium pH	Bakteri <i>comammox</i> yang terdeteksi adalah <i>Candidatus Nitrospira inopinata</i> dan <i>Candidatus Nitrospira nitrificans</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Amonium berkorelasi positif dengan kelimpahan <i>comammox</i> OTU 1 dan 2 - Amonium berkorelasi negatif dengan kelimpahan <i>comammox</i> OTU 3 - pH berkorelasi positif dengan kelimpahan <i>comammox</i> OTU 4 dan 5 - pH berkorelasi negatif dengan keimpahan <i>comammox</i> OTU 3 	(Xie et al., 2023)
6	<i>Pearl River Estuary</i> (PRE), China Selatan	TN TOC TC Amonium Nitrat Nitrit Salinitas pH Kedalaman	Bakteri <i>comammox</i> yang terdeteksi adalah <i>Candidatus Nitrospira nitrificans</i> dan <i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> - TN, TC, TOC, amonium, nitrat, dan nitrit berkorelasi positif terhadap kelimpahan <i>comammox</i> - pH, salinitas, dan kedalaman berkorelasi negatif terhadap kelimpahan <i>comammox</i> 	(Z. Liu et al., 2022)
7	Lahan pertanian, sawah, dan zona sedimen sungai	Amonium pH TNK TC	Bakteri <i>comammox</i> yang terdeteksi adalah <i>Candidatus Nitrospira inopinata</i> , <i>Candidatus Nitrospira nitrificans</i> ,	<ul style="list-style-type: none"> - pH dan amonium berkorelasi negatif terhadap kelimpahan <i>comammox</i> - TN dan TC berkorelasi positif terhadap kelimpahan <i>comammox</i> 	(H. Zhang et al., 2022)

			dan <i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i>		
8	Sungai dan lahan muara basah Zhengzhou Henan, China	pH TN Amonium Nitrat Fosfat	Bakteri <i>comammox</i> yang terdeteksi adalah <i>comammox</i> clade A (<i>Candidatus Nitrospira inopinata</i> , <i>Candidatus Nitrospira nitrificans</i> dan <i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i>), clade B (uncultured) dan <i>comammox</i> tidak terklasifikasi	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Comammox Clade A</i> berkorelasi positif dengan TN, nitrat dan fosfat - <i>Comammox Clade A</i> tidak berkorelasi dengan pH dan ammonium - <i>Comammox Clade B</i> berkorelasi negatif dengan TN, nitrat dan fosfat - <i>Comammox Clade B</i> tidak berkorelasi dengan pH dan ammonium - <i>Comammox</i> tidak terklasifikasi berkorelasi negatif dengan pH - <i>Comammox</i> tidak terklasifikasi tidak berkorelasi dengan TN, amonium, nitrat dan fosfat. 	(H. Liu et al., 2023)



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Umum

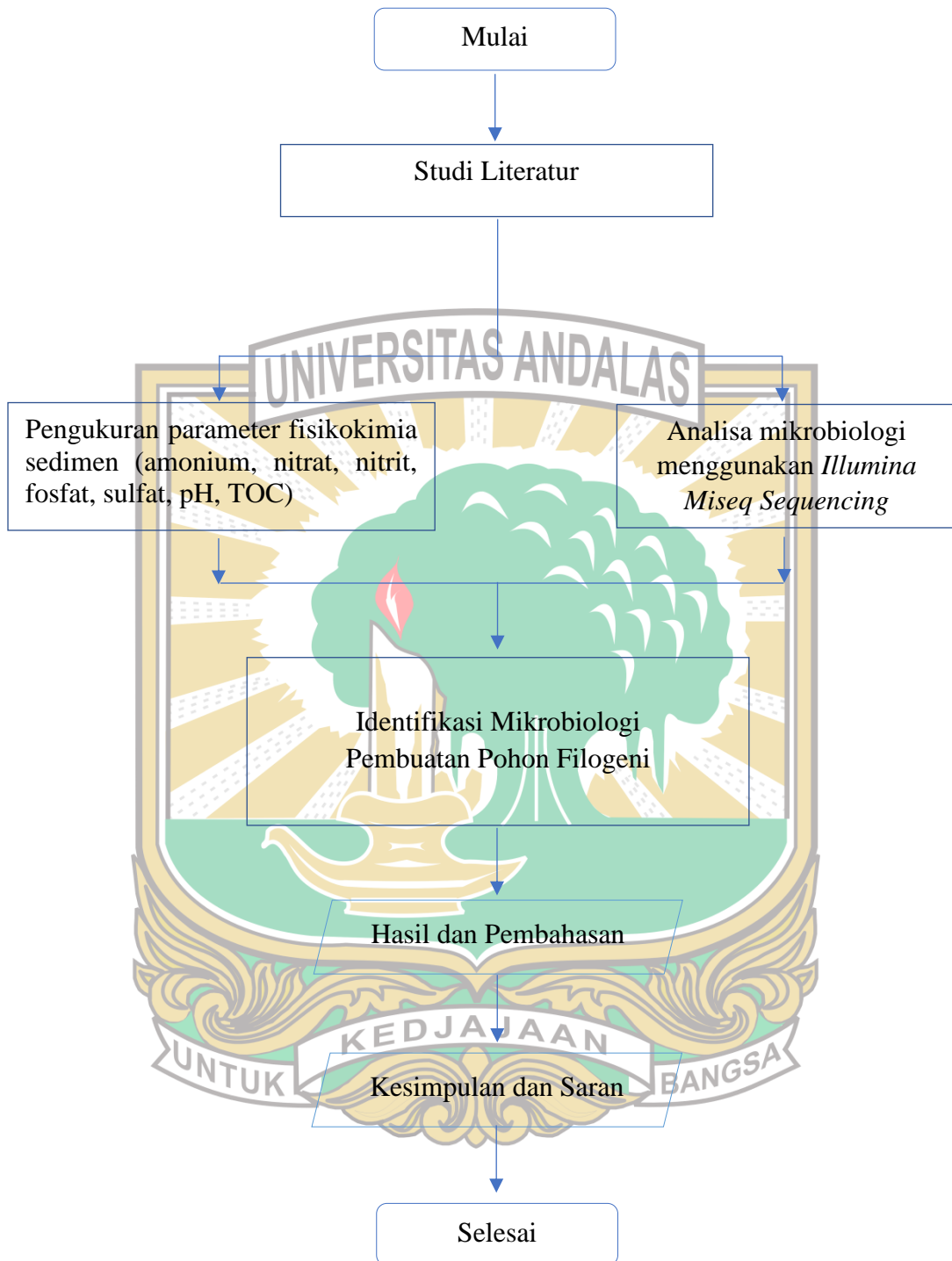
Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi dan mengidentifikasi kelimpahan bakteri *comammox* pada sistem buatan di Kota Padang serta parameter fisikokimia yang terkait. Lokasi sampel sedimen diambil 5 sistem buatan yang berbeda yaitu IPAL Pabrik Karet, saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu, IPAL RSP Universitas Andalas, IPLT, dan IPL TPA Air Dingin yang berada di Kota Padang. Pengukuran parameter lingkungan air limbah (pH, DO, suhu, dan salinitas) dilakukan langsung pada badan air dan pengukuran parameter kualitas sedimen (pH, TOC, amonium, nitrat, nitrit, fosfat, sulfat) dilakukan di laboratorium Teknik Lingkungan Universitas Andalas. Pengidentifikasian bakteri *comammox* dilakukan dengan metode *Next Generation Sequencing* (NGS) menggunakan *Illumina Miseq Sequencing* di *Kanazawa University*.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Waktu pengambilan sampel dilaksanakan pada bulan Februari 2023 (**Tabel 3.1**). Pengambilan sampel dilakukan pada 5 titik yaitu IPAL Pabrik Karet, saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu, IPAL RSP Universitas Andalas, IPLT, dan IPL TPA Air Dingin yang berada di Kota Padang yang dapat dilihat pada **Tabel 3.1**. Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Air, Laboratorium Mikrobiologi, Teknik Lingkungan dan Laboratorium Teknik Sipil Universitas Andalas, serta *Water Laboratory* dan *Microbiology Laboratory Kanazawa University*, Jepang.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian meliputi studi literatur, persiapan penelitian, pengambilan sampel, pengukuran amonium, nitrat, nitrit, pH dan TOC, analisis mikroorganisme dengan *Illumina Miseq Sequencing* dan pembuatan pohon filogeni. Diagram alir dari metodologi penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Diagram Alir Metodologi Penelitian

3.3.1 Studi Literatur

Studi literatur dilakukan sebelum dilaksanakannya penelitian di laboratorium. Studi literatur mencakup tentang ilmu dasar penelitian dan pelaksanaan saat penelitian. Studi literatur bertujuan untuk mendapatkan segala informasi yang berkaitan dengan percobaan penelitian seperti informasi terkait *complete ammonia oxidation* (*comammox*), dan proses identifikasi komunitas mikrob.

3.3.2 Persiapan Sebelum Sampling

Sebelum melakukan sampling di lapangan hal yang perlu disiapkan adalah alat dan bahan yang akan digunakan pada saat pengambilan sampel. Alat dan Bahan yang disiapkan adalah sebagai berikut:

Peralatan :

- 1) pH meter;
- 2) *Salinity tester*;
- 3) DO meter;
- 4) Alat pengukur kedalaman;
- 5) Meteran;
- 6) Kotak pendingin;
- 7) GPS;
- 8) Alat dokumentasi;
- 9) Alat tulis;
- 10) Botol semprot.

Bahan :

- 1) *Aquadest*;
- 2) Label;
- 3) Kertas tisu.

3.3.3 Pengukuran Parameter Lingkungan Kualitas Air

Pengukuran parameter lingkungan kualitas air berupa Suhu, *Dissolved Oxygen* (DO), derajat keasaman (pH), dan Salinitas menggunakan alat ukur pH meter dan *salinity tester* merek HANNA serta DO meter. Pengukuran parameter dilakukan secara langsung dari badan air.

3.3.4 Pengambilan Sampel Sedimen

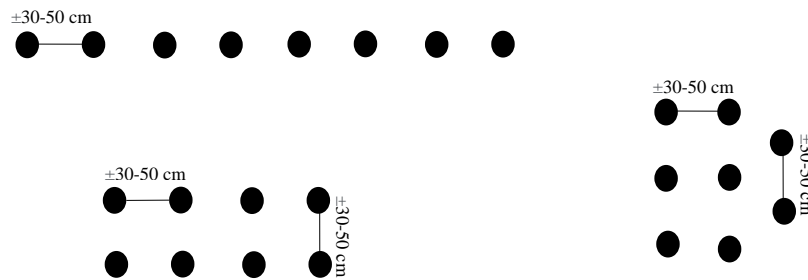
Bakteri *comammox* merupakan jenis bakteri yang hidup berkoloni membentuk biofilm, yang melekat pada suatu permukaan (media). Media pertumbuhan *comammox* pada penelitian ini adalah sedimen. Sedimen merupakan hasil produk disintegrasi dan dekomposisi batuan yang bersifat menetap pada perairan, sehingga sedimen dapat mewakili kondisi suatu perairan dalam jangka waktu yang cukup lama. Pengambilan sampel sedimen pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan alat *Ekman grab sampler* dan *scoop*. *Ekman grab* merupakan salah satu peralatan pengambilan sampel sedimen dengan kedalaman yang lebih dari 100 cm. Prinsip penggunaan alat ini yaitu mengambil sampel sedimen dengan menggunakan capit seperti keping. Pengambilan sedimen pada lokasi yang kering atau dengan perairan dangkal menggunakan *scoop*. Prinsip penggunaan *scoop* yaitu mengambil sedimen dari atas permukaan hingga kedalaman yang diinginkan. Sampel sedimen diambil pada 8 titik lokasi pengambilan yang berbeda dengan radius 30-50 cm (Wang et al., 2023; Gao & Tao, 2011). Penentuan titik lokasi pengambilan didasarkan pada aktivitas sekitar lokasi yang dapat memengaruhi kualitas lokasi (ada atau tidaknya pencemar) dengan satu kali pengambilan sampel. Lokasi dan waktu pengambilan sampel dapat dilihat pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Lokasi dan Waktu Pengambilan Sampel

No.	Lokasi Pengambilan Sampel	Waktu Pengambilan Sampel	Jumlah Titik Sampling
1	IPL TPA Air Dingin	6 Februari 2023	8
2	IPAL Pabrik Karet	8 Februari 2023	8
3	Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	14 Februari 2023	8
4	IPAL RSP UNAND	15 Februari 2023	8
5	IPLT	21 Februari 2023	8

Alat yang dibutuhkan dalam pengambilan sampel sedimen yaitu *Ekman grab*, *scoop*, serta ember atau baki plastik. Sampel sedimen yang dikumpulkan disimpan dalam kantong *zip lock* steril berukuran 11 x 8 cm, disegel, dan didinginkan dengan

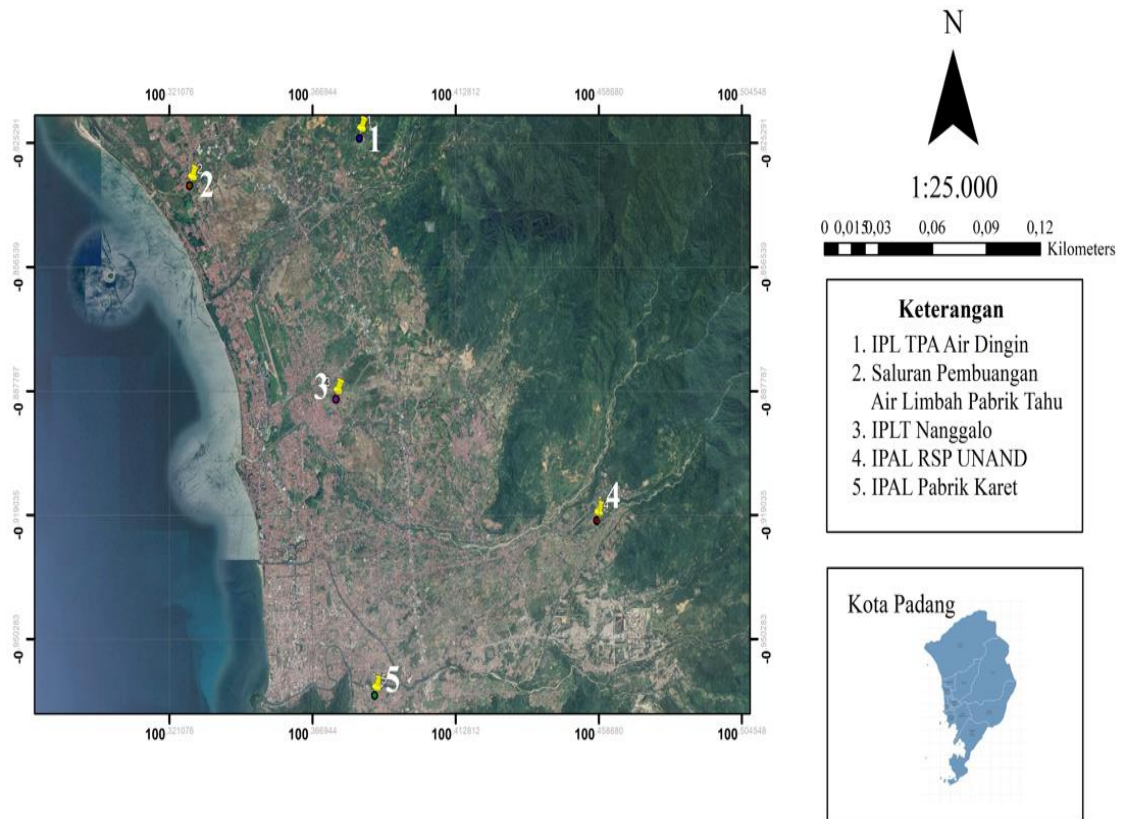
kotak pendingin yang berisi es dan dibawa ke laboratorium. Gambar plot pengambilan sampel berdasarkan kondisi badan air dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Plot pengambilan sampel sedimen

Sumber: Wanget al. 2023

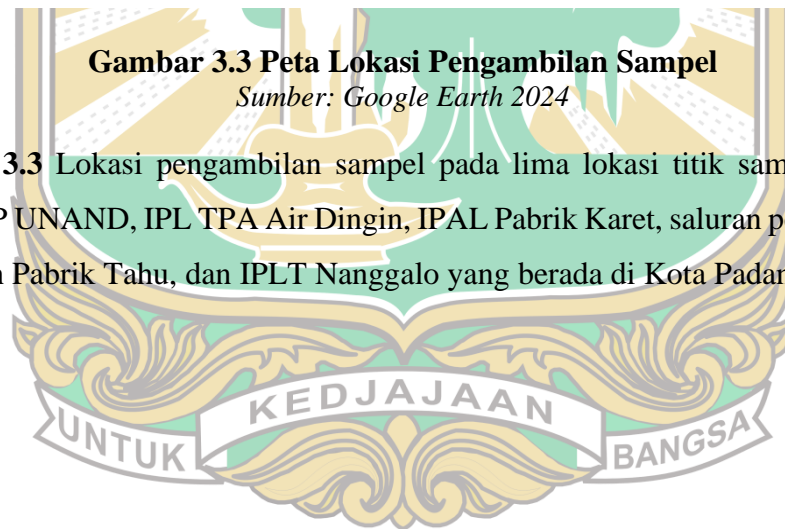
Di laboratorium, sampel sedimen yang diperoleh dari masing-masing plot di setiap lokasi digabung dan dicampur menggunakan sarung tangan, untuk mendapatkan sampel komposit yang homogen untuk setiap lokasi pengambilan sampel. Semua batu, cangkang, detritus, akar dan benda asing lainnya harus dikeluarkan dari sampel. Terakhir, sampel komposit dibagi menjadi 2 bagian, satu bagian untuk analisis parameter kimia sedimen (pH, TOC, amonium, nitrat, nitrit, fosfat dan sulfat) dan bagian kedua untuk analisis mikrobiologi. 10 mL sedimen basah ditambahkan 40 mL etanol 50% dan dimasukkan ke dalam tabung *centrifuge*. Selanjutnya sampel dikirim ke *Kanazawa University* untuk diukur menggunakan *Illumina Miseq* untuk mengetahui jenis bakteri yang tumbuh di dalam sedimen.



Gambar 3.3 Peta Lokasi Pengambilan Sampel

Sumber: Google Earth 2024

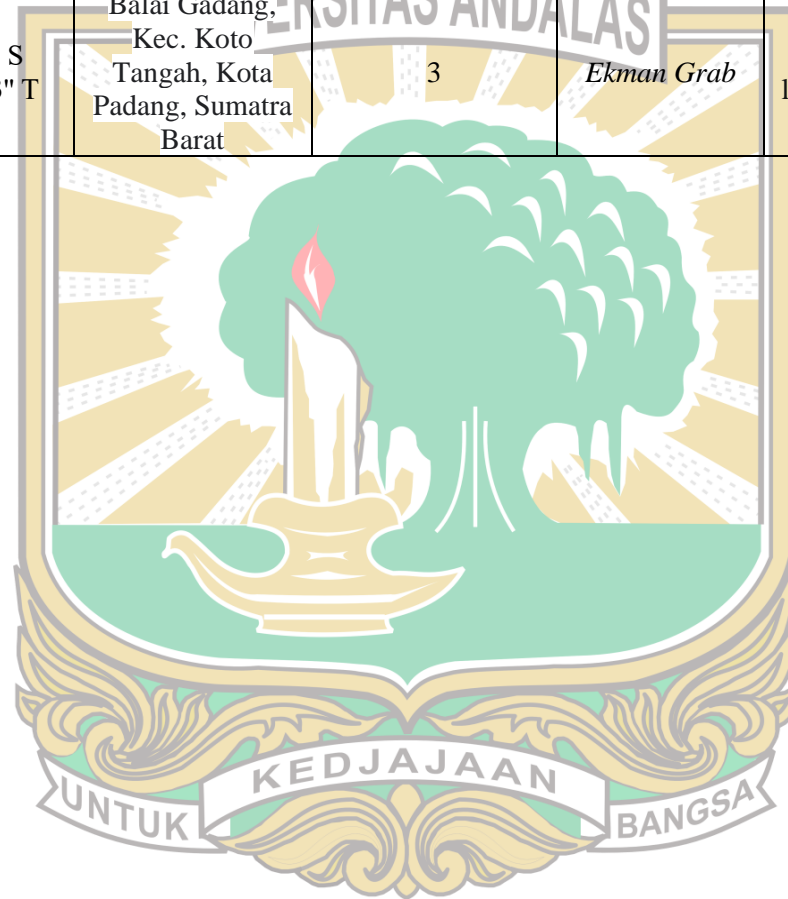
Gambar 3.3 Lokasi pengambilan sampel pada lima lokasi titik sampling yaitu IPAL RSP UNAND, IPL TPA Air Dingin, IPAL Pabrik Karet, saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu, dan IPLT Nanggalo yang berada di Kota Padang.



Tabel 3.2 Lokasi dan Titik Pengambilan sampel

No	Lokasi Sampel	Koordinat	Alamat	Kedalaman (m)	Metode sampling	Keterangan Lokasi	Alasan Pemilihan Lokasi
1	IPLT Nanggalo	0°53'22" S 100°22'27" T	Surau Gadang, Kec. Nanggalo, Kota Padang, Sumatra Barat	4	<i>Ekman Grab</i>	Sludge drying bed (Kolam Aerob)	Tempat pembuangan akhir tinja di Kota Padang
2	IPAL Pabrik Karet	0°57'55" S 100°23'11" T	Jl. Raya Banuaran No.21, Kel, Banuaran Nan XX, Kec. Lubuk Begalung, Kota Padang, Sumatra Barat	3	<i>Ekman Grab</i>	Penampungan menuju reaktor Multi Soil Layering (MSL) pengolahan air limbah karet (Kolam Aerob)	Kawasan Industri yang mengandung Limbah senyawa kimia dan berbahaya lainnya
3	IPAL RSP UNAND	0°54'55" S 100°27'29" T	Komp. Kampus Unand Jl. Universitas Andalas, Limau Manis, Kec. Pauh, Kota Padang, Sumatra Barat	5	<i>Ekman Grab</i>	Sumur pengumpul limbah cair (Kolam Aerob)	Salah satu rumah sakit pemerintahan alternatif yang ramai dikunjungi
4	Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	0°50'9" S 100°19'42" T	Jl. Adinegoro No.13, Lubuk Buaya, Kec. Koto Tengah, Kota Padang, Sumatra Barat	1,5	<i>Ekman Grab</i>	Bak penampung limbah cair	Kawasan Kuliner <i>Homemade</i> yang sering dikunjungi

No	Lokasi Sampel	Koordinat	Alamat	Kedalaman (m)	Metode sampling	Keterangan Lokasi	Alasan Pemilihan Lokasi
5	IPL TPA Air Dingin	0°49'25" S 100°22'53" T	Balai Gadang, Kec. Koto Tengah, Kota Padang, Sumatra Barat	3	<i>Ekman Grab</i>	Kolam pengolahan lindi (Kolam Aerob)	Pusat pembuangan dan pemrosesan akhir sampah di Kota Padang



3.3.5 Persiapan Analisis Parameter Lingkungan

Hal yang perlu disiapkan sebelum melakukan analisis parameter lingkungan yaitu alat dan bahan serta preparasi sampel.

3.3.5.1 Alat dan Bahan

Persiapan alat dan bahan pada tahap ini meliputi empat tahap, yaitu pengkompositan sampel, pengeringan sampel, pengayakan sampel dan analisis sampel yang dilakukan di laboratorium. Alat yang digunakan pada pengkompositan sampel yaitu *beaker glass* 500 mL dan alat pengaduk. Alat yang digunakan pada pengeringan sampel yaitu plastik berukuran ± 90 x 90 cm yang telah dibelah dan dibentangkan. Alat dan Bahan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 3.3**.

Tabel 3.3 Alat dan Bahan Yang Digunakan

No.	Kegiatan	Alat	Bahan
1	Pengompositan sampel	<i>Beaker glass</i> Spatula	-
2	Persiapan sampel yang dibawa ke Jepang	Tabung <i>centrifuge</i> <i>Beaker glass</i> Spatula	Etanol 50%
3	Pengeringan sampel	Spatula	Plastik
4	Pengayakan sedimen	Mortal dan alu <i>Shieve shaker</i> Ayakan no. 30 Ayakan no. 50	Plastik
5	Penimbangan sampel	Neraca analitik <i>Beaker glass</i> Spatula	<i>Plastik wrap</i>
6	Ekstraksi sedimen	<i>Erlenmeyer</i> Pipet ukur <i>Hot plate</i> <i>Shaker</i> <i>Magnetic stirrer</i> Bola hisap Labu ukur Tabung reaksi Corong Labu semprot Batang pengaduk	H ₂ SO ₄ pekat HCl <i>Aquadest</i> NaOH NH ₄ F KH ₂ PO ₄ NaCl CuSO ₄ Ag ₂ SO ₄ MgCO ₃ NaHCO ₃ K(SbO) ₃ C ₄ H ₄ O ₆ ·½H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O Kertas saring
7	Analisis spektrofotometri	Spektrofotometer UV-Vis Kuvet Labu semprot	<i>Aquadest</i>
8	Analisis mikrobiologi (Ekstraksi DNA)	<i>Fast DNA SPIN Kit for Soil</i>	

3.3.5.2 Pengeringan Sampel Sedimen

Pengeringan sampel sedimen dilakukan sesuai dengan persiapan pembuatan ekstrak untuk pengujian kimia sedimen pada SNI 4819-2013. Sampel sedimen yang telah dikomposit dikering-anginkan secara manual hingga kering. Sedimen yang kering tidak memiliki kandungan air yang ditandai dengan tekstur yang berderai. Sampel sedimen ditebar di atas plastik berukuran $\pm 90 \times 90$ cm yang telah dibelah dan dibentangkan. Plastik diberi label pada masing-masing sampel. Pengeringan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Lingkungan Universitas Andalas. Pengeringan udara ini dilakukan di dekat jendela selama 1-3 hari tergantung jenis sedimen yang dikeringkan dan cuaca pada saat pengeringan.

3.3.5.3 Pengayakan Sampel Sedimen Kering

Sampel sedimen yang telah kering dihaluskan (jika kering dalam keadaan menggumpal) dengan menggunakan mortal dan alu. Setelah dihaluskan, sampel sedimen kering dibawa menuju laboratorium Departemen Teknik Sipil Universitas Andalas untuk disaring dengan alat *sieve shaker* pada diameter $< 0,5$ mm. sampel yang telah disaring disimpan dalam plastik dan ditutup rapat. Selanjutnya sampel siap untuk pengujian parameter kimia sedimen yaitu pH, TOC, amonium, nitrat, nitrit, fosfat dan sulfat.

3.3.5.4 Penyimpanan Sampel Sedimen

Penyimpanan sampel sedimen dilakukan sesuai dengan persiapan pembuatan ekstrak untuk pengujian kimia sedimen pada SNI 4819-2013. Sampel disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C .

3.3.6 Analisis Parameter Fisikokimia

Sebelum dilakukan pengujian parameter kimia, sampel sedimen diekstrak berdasarkan SNI 4819:2013 agar dapat diuji dengan standar pengujian air. Selanjutnya sedimen yang sudah diekstrak dianalisis kandungan TOC, amonium, nitrit, nitrat, fosfat dan sulfat menggunakan metode spektrofotometri, yaitu dengan memanfaatkan serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang tertentu dengan alat spektrofotometer UV-VIS. Analisis dilakukan secara triplo (3 kali pengulangan). Untuk pengukuran pH dilakukan

dengan menggunakan alat pH meter. Penjelasan tentang metode analisis yang dilakukan dapat dilihat pada **Tabel 3.4**.

Tabel 3.4 Metode Analisis

Parameter	Metode	Alat	Acuan
pH	Elektrometik	AZ 86031 Water Quality Meter	APHA 4500 – H ⁺
TOC	Spektrofotometri	Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800)	SNI 06-6989.28-2005
Amonia	Nessler	Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800)	SNI 06-2479-1991
Nitrit	Spektrofotometri	Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800)	SNI 06-6989.9-2004
Nitrat	Spektrofotometri Skrining Ultra Violet	Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800)	APHA 2017
Fosfat	Spektrofotometri	Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800)	SNI 06-6989.31-2005
Sulfat	Spektrofotometri	Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800)	SNI 6989.20:2009
16s RNA	NGS	<i>Illumina Miseq Sequencing</i>	MP Biomedicals

3.3.7 Metode Analisis Mikrobiologi dengan *Illumina MiSeq Sequencing*

Identifikasi bakteri dilakukan dengan *Illumina Miseq Sequencing* di *Kanazawa University* (Jepang). Adapun prosedur persiapan untuk pengiriman sampel ke *Kanazawa University* adalah sebagai berikut:

1. Ukur 10 mL sedimen basah;
2. Tambah 40 mL etanol 50%;
3. Masukkan ke dalam tabung *centrifuge*;
4. Tabung ditutup rapat dan dikemas dengan aman;
5. Sampel yang telah didiamkan selama 3-4 minggu siap dikirim ke *Kanazawa University* untuk diukur menggunakan *Illumina Miseq* untuk mengetahui jenis bakteri yang tumbuh di dalam sedimen (Daebeler et al., 2023).

Analisis mikrobiologi dengan *Illumina MiSeq Sequencing* dilakukan di *Kanazawa University*. Sebanyak 2 mL sampel sedimen *disentrifuge* pada 6.000 rpm selama 10 menit. Sampel diresuspensi dalam garam buffer fosfat (PBS pH 7,4) dan *disentrifuge* lagi. DNA secara langsung diambil dari sampel ini menggunakan *Fast Kit for Soil* sesuai dengan instruksi pabrik. Hasil identifikasi mikrobiologi dengan *Illumina Miseq Sequencing* yaitu berupa tingkat keberagaman dari setiap genus dan

spesies bakteri, persentase dari masing-masing spesies, serta kelimpahan dari bakteri yang ada di dalam sedimen (Liu et al., 2021).

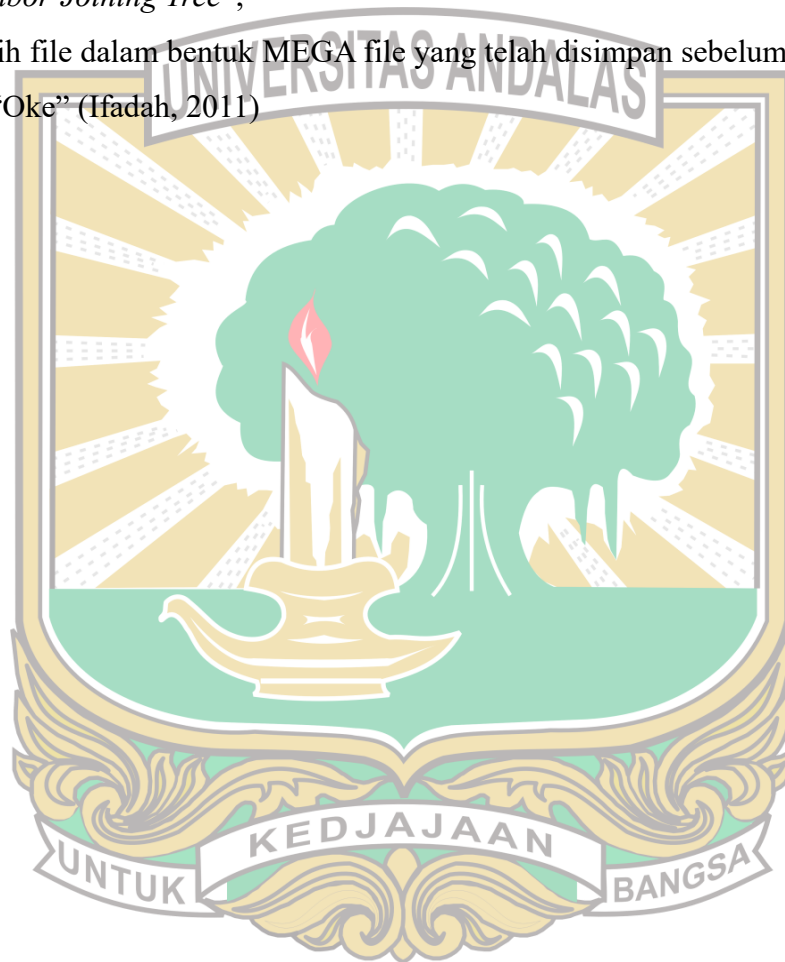
3.3.8 Analisis Filogeni

Hubungan kekerabatan antar spesies dapat dijelaskan dengan filogeni yang merupakan hasil analisis filogeni molekuler. Informasi yang tersedia pada analisis ini ialah sekuen DNA yang merupakan hasil dari analisis komunitas mikrob yang dilakukan di *Kanazawa University*, Jepang. Spesies bakteri yang belum teridentifikasi pada analisis komunitas mikrob sebelumnya akan dilakukan proses penyejajaran sekuen yang diperoleh terhadap sekuen *database* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mendapatkan sekuen referensi. Sekuen-sekuen ini selanjutnya diolah dan dianalisis hubungan kekerabatan antar spesies mikrob dengan menggunakan *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA *software*). Bentuk *output* dari sistem ini yaitu spesies mikrob yang disusun bercabang-cabang seperti pohon, atas dasar kesamaan molekulernya (Ifadah, 2011).

Adapun tahapan dalam penyusunan pohon filogeni adalah sebagai berikut:

1. MEGA *software* diinstall di dalam laptop/PC dengan cara mengakses <https://www.megasoftware.net/>;
2. Sekuen referensi dari proses BLAST didapatkan dengan cara memasukkan sekuen bakteri yang diperoleh ke kolom BLAST pada situs NCBI dengan mengakses <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, kemudian dipilih sekuen bakteri pembandingan dengan persentase *identity* tertinggi;
3. Pohon filogeni pada MEGA *software* disusun berdasarkan sekuen DNA atau susunan nukleotida, yang data sekuennya didapatkan dari GenBank dengan mengakses situs NCBI;
4. Pada halaman utama NCBI, “*All Database*” diubah menjadi “*Nucleotide*”;
5. Dicari spesies bakteri yang ingin diketahui sekuennya;
6. Dipilih sekuen yang diinginkan, klik “*Send To*”, “*File*” dan dipilih format “*FASTA*”;
7. MEGA *software* dibuka, dipilih *tool* “*Align*” dan “*Edit/Build Alignment*”;
8. Dipilih “*Create a New Alignment*” dan akan terbuka halaman baru;
9. Dipilih *tool* “*Edit*” dan “*Insert Sequence from File*”;

10. Dipilih semua file FASTA yang telah disimpan sebelumnya;
11. CTRL+A pada *keyboard*, dipilih *tool* “*Alignment*”, “*Alignment by ClustalW*” dan “Oke”;
12. Data sekuen dirapikan dengan memotong susunan basa yang tidak lengkap atau tidak dominan;
13. Dipilih *tool* “Data”, “*Export Alignment*” dan “MEGA Format”;
14. Kembali ke halaman awal, dipilih *tool* “*Phylogeny*” dan “*Construct/Test Neighbor-Joining Tree*”;
15. Dipilih file dalam bentuk MEGA file yang telah disimpan sebelumnya, dan klik “Oke” (Ifadah, 2011)



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Umum

Bab ini menjelaskan tentang hasil penelitian yang telah dilakukan dan dilengkapi dengan analisis serta pembahasan terhadap hasil penelitian yang telah didapat. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 5 sampel sedimen berasal dari sistem buatan. Sebagian sedimen disisihkan untuk dilakukan analisis mikrobiologi, dan sisanya dikeringkan untuk analisis kandungan amonia, nitrit, nitrat, fosfat, sulfat, dan TOC.

Sebagian sedimen yang disisihkan dilakukan analisis mikrobiologi, dan sisanya dikeringkan untuk analisis kandungan nitrogen dan fosfat. Selanjutnya sedimen kering diekstrak dan dianalisis kandungan nitrogen dan fosfat nya dengan metode spektrofotometri. Adapun pembahasan pada bab ini terdiri dari analisis parameter lingkungan, analisis kandungan nitrogen sedimen, analisis kandungan fosfat sedimen, identifikasi bakteri *comammox*, pada sistem buatan di Kota Padang.

4.2 Parameter Lingkungan

4.2.1 Karakteristik Parameter Fisikokimia Air Limbah pada Lokasi Sampling

Tabel 4.1 Karakteristik Parameter Fisikokimia Air Limbah pada Lokasi Sampling

No.	Lokasi Sampling	pH Air	DO (mg/L)	Suhu (°C)	Salinitas (ppt)	Cuaca	Titik Koordinat
1.	IPLT Nanggalo	6,8	2,2	34	0,2	Cerah	0°53'22" S 100°22'27" T
2.	IPAL Pabrik Karet	6,7	3,1	30	0	Cerah	0°57'55" S 100°23'11" T
3.	IPAL RSP UNAND	6,5	2,7	30,4	0,4	Cerah	0°54'55" S 100°27'29" T
4.	Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	6,6	2,9	32,1	0	Cerah	0°50'9" S 100°19'42" T
5.	IPL TPA Air Dingin	5,5	3,4	30,5	0	Cerah	0°49'25" S 100°22'53" T

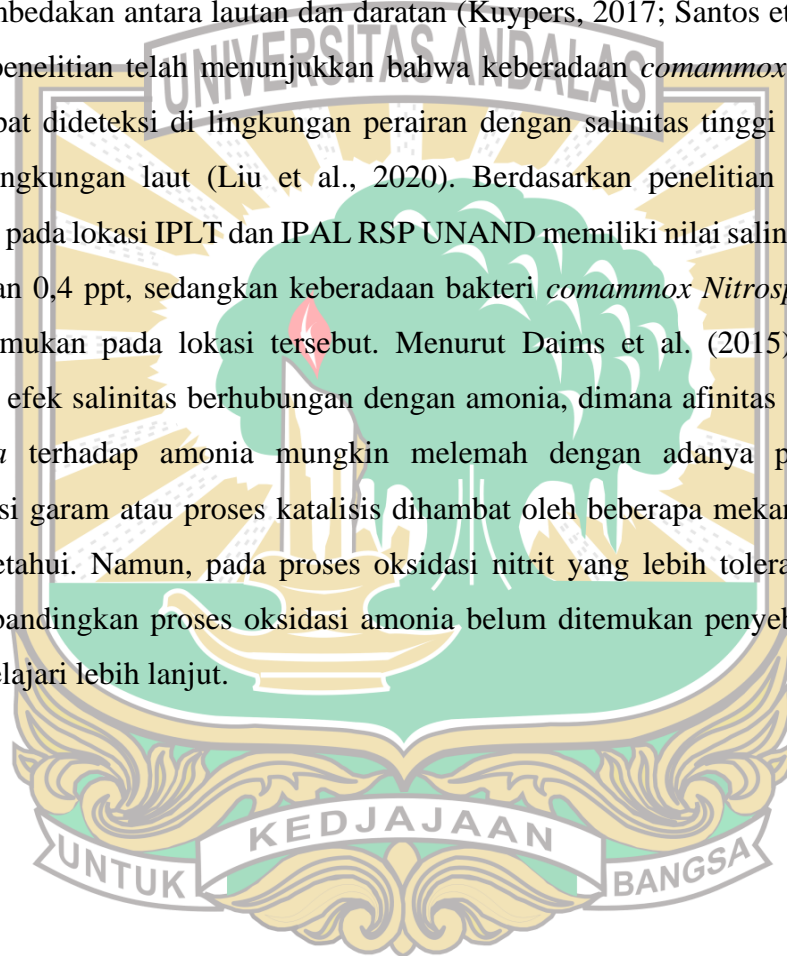
Berdasarkan hasil pengukuran DO dapat dilihat bahwa nilai DO yang tertinggi berada pada lokasi IPL TPA Air Dingin yaitu 3,4 mg/L dan yang terendah adalah pada lokasi IPLT yaitu 2,2 mg/L. Menurut Ikhfini et al. (2023) mikroorganisme dapat hidup dengan baik pada kadar oksigen minimal 5 ppm. Dengan peningkatan kadar oksigen terlarut maka akan meningkatkan jumlah spesies makhluk hidup di suatu perairan begitupun sebaliknya. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Huang et al. (2010) dan, G. Liu dan Wang, (2013), bakteri *comammox Nitrospira* mengalami peningkatan pada konsentrasi DO yang rendah (1,0 mg/L). Hal ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Roots et al. (2019), dimana bakteri *comammox Nitrospira* ditemukan sebesar 53% pada konsentrasi DO yang rendah (0,2–1 mg/L). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *comammox* mampu tumbuh dan berkembang serta kompetitif pada konsentrasi DO yang rendah (S. Luo et al., 2022)

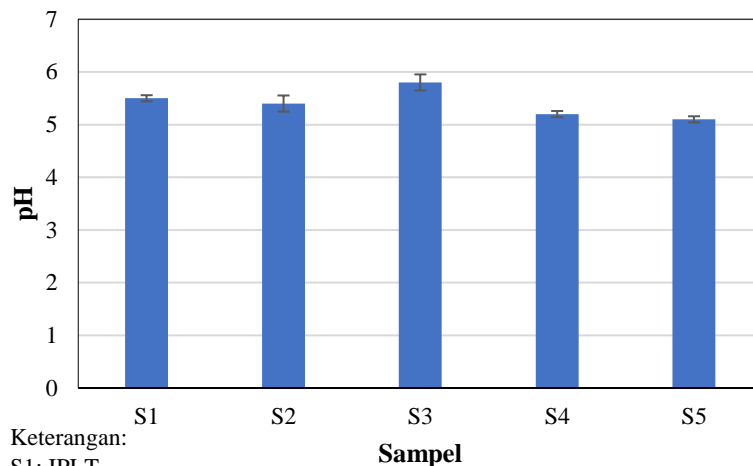
Untuk parameter suhu, nilai rentang suhu pada kelima lokasi sampel yaitu berkisar antara 30°C – 37°C. suhu yang tertinggi berada pada lokasi IPLT sebesar 34°C dan yang terendah pada pabrik karet yaitu 30°C. IPLT lokasinya berada di luar ruangan yang dapat menyebabkan suhunya lebih tinggi daripada yang lainnya, sedangkan IPAL Pabrik Karet posisinya berada di dalam ruangan sehingga suhunya cenderung sama dengan suhu ruangan tersebut. Hal ini sejalan dengan pendapat Yao & Peng, (2017); Blackburne et al. (2007) yang menyatakan bahwa suhu optimal untuk pertumbuhan *comammox Nitrospira* adalah pada kisaran 30-35 °C. Berdasarkan penelitian Huang et al. (2010) yang menganalisis pengaruh suhu terhadap *comammox Nitrospira* dalam reaktor biologis IPAL kota yaitu pada kisaran 24-30°C, tergantung musim. Selain itu, selama studi kultur murni pada *comammox Nitrospira* yang dilakukan oleh Jia et al. (2017) menunjukkan bahwa bakteri ini tumbuh pada suhu antara 30-35°C. Dampak musiman terhadap pertumbuhan *comammox Nitrospira* yang diamati oleh Jia et al. (2017) menyatakan bahwa dalam sistem lahan basah skala laboratorium, *Nitrospira* selalu lebih tinggi pada musim panas yaitu sebesar 12% dibandingkan dengan musim dingin sekitar 4,1% dan suhu rata-rata pada musim-musim ini adalah 25,6 dan 9,2 °C.

Menurut Blackburne et al. (2007) kisaran suhu optimal untuk pertumbuhan *comammox Nitrospira* yaitu sebesar 30–35 °C. Dampak negatif suhu tinggi (di atas

40°C) juga ditemukan oleh Luo et al. (2017). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Zekker et al. (2017), peningkatan suhu dari 25°C menjadi 40°C dapat menyebabkan penurunan konsentrasi amonia sehingga menghambat pertumbuhan bakteri *comammox Nitrospira*.

Keberadaan serta penyebaran *comammox Nitrospira* berkaitan erat dengan sejumlah faktor lingkungan, namun belum diketahui secara pasti faktor lingkungan mana yang menjadi pendorong utamanya. Salinitas merupakan faktor lingkungan yang membedakan antara lautan dan daratan (Kuypers, 2017; Santos et al., 2018). Namun, penelitian telah menunjukkan bahwa keberadaan *comammox Nitrospira* masih dapat dideteksi di lingkungan perairan dengan salinitas tinggi yang mirip dengan lingkungan laut (Liu et al., 2020). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada lokasi IPLT dan IPAL RSP UNAND memiliki nilai salinitas sebesar 0,2 ppt dan 0,4 ppt, sedangkan keberadaan bakteri *comammox Nitrospira* sedikit yang ditemukan pada lokasi tersebut. Menurut Daims et al. (2015), potensial mengenai efek salinitas berhubungan dengan amonia, dimana afinitas *comammox Nitrospira* terhadap amonia mungkin melemah dengan adanya peningkatan konsentrasi garam atau proses katalisis dihambat oleh beberapa mekanisme yang tidak diketahui. Namun, pada proses oksidasi nitrit yang lebih toleran terhadap garam dibandingkan proses oksidasi amonia belum ditemukan penyebabnya dan perlu dipelajari lebih lanjut.





Keterangan:

S1: IPLT

S2: Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu

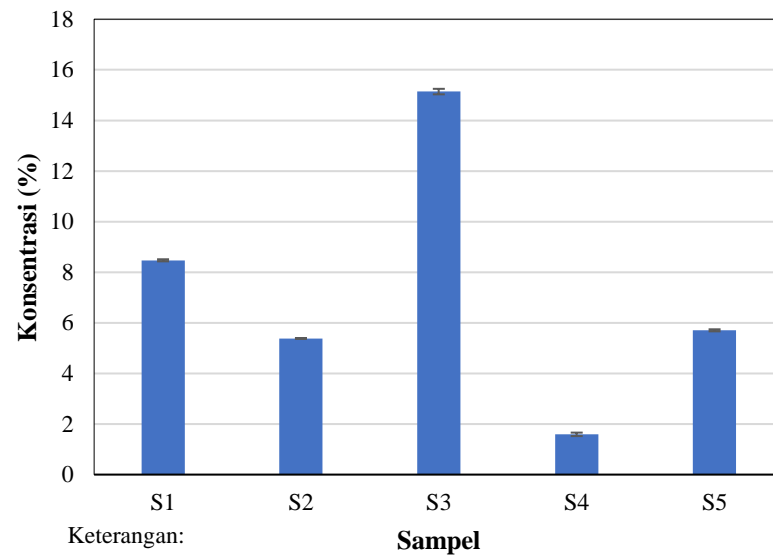
S3: IPAL RSP UNAND

S4: IPL TPA Air Dingin

S5: IPAL Pabrik Karet

Gambar 4.1 Hasil Analisis Parameter pH Sedimen

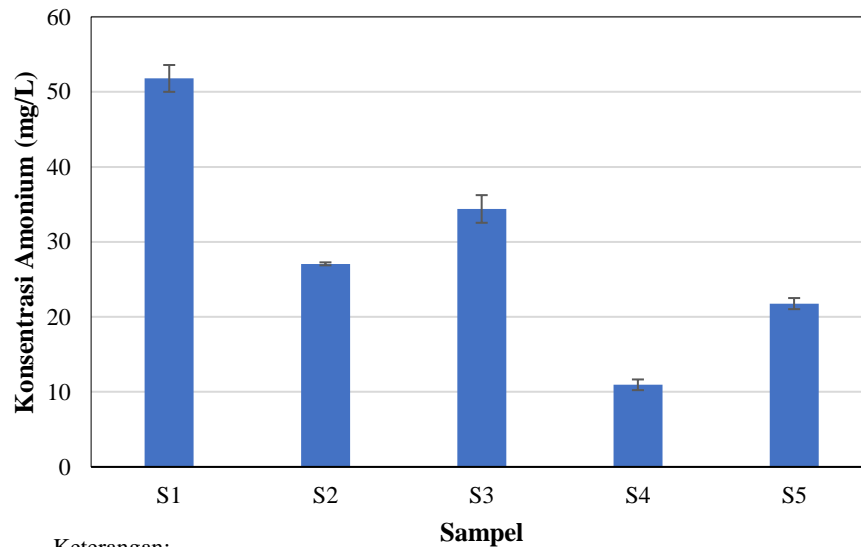
Berdasarkan **Gambar 4.1** dapat dilihat bahwa hasil pengukuran pH sedimen tertinggi diperoleh pada lokasi IPAL RSP UNAND yaitu 5,8. Sedangkan pada lokasi IPAL Pabrik Karet, nilai pH yang didapatkan lebih rendah yaitu 5,1, yang mana pH ini cenderung asam. Hal ini dapat terjadi karena buangan limbah cair dari pabrik karet tersebut yang mengandung senyawa organik sehingga dapat menurunkan nilai pH dan bersifat asam (Sepriani et al., 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Grunditz & Dalhammar, (2001); Blackburne et al. (2007) yang menyatakan bahwa bakteri yang mirip dengan *comammox Nitrospira* sensitif terhadap pH tinggi (>9,0) karena meningkatkan amonia bebas dan menghambat aktivitas dalam nitrifikasi. Menurut Blackburne et al. (2007), pH optimum *comammox Nitrospira* berada pada kisaran 8,0-8,3. pH optimal yang serupa juga ditemukan oleh Zhang et al. (2018) dalam reaktor nitrifikasi. Menurut Mota et al. (2005), pH optimum *Nitrospira* berkisar antara 7,6-7,8 pada lima reaktor aerasi nitrifikasi. Sedangkan menurut Sun et al. (2021), pH merupakan faktor penting yang memengaruhi kelimpahan dan komposisi komunitas *comammox Nitrospira*. Selain itu dalam beberapa penelitian sebelumnya juga menunjukkan *comammox Nitrospira* memiliki kelimpahan yang tinggi pada tanah yang bersifat asam dan dapat beradaptasi dengan pH yang lebih rendah Sun et al. (2021) dan Shi et al. (2018).



Gambar 4.2 Kandungan TOC Sedimen

Berdasarkan **Gambar 4.2**, dapat dilihat bahwa pengujian TOC terhadap 5 lokasi sampel, yang memiliki nilai TOC tertinggi adalah pada IPAL RSP UNAND sebesar 15,14% (151.400 mg/L). Menurut Majumder et al. (2020) limbah rumah sakit kaya akan mikroorganisme yang ditandai dengan tingginya kandungan TOC. Majumder et al. (2020) menjelaskan bahwa kadar TOC IPAL Rumah Sakit yang berada di Thailand yaitu sebesar 1.050 mg/L. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya akumulasi sisa-sisa bahan kimia dan zat organik dalam proses perawatan medis terutama pada obat-obatan serta limbah laboratorium seperti senyawa organik, klorida, nitrit, dan logam berat (Pariante et al., 2022). Yang et al. (2024), menjelaskan bahwa TOC merupakan faktor pendorong penting yang membentuk komposisi *comammox Nitrospira* untuk berkembang biak, dimana *comammox Nitrospira* dapat beradaptasi lebih baik pada kondisi karbon terbatas (Lawson & Lücker, 2018). Nilai TOC terendah yaitu pada IPL TPA Air Dingin sebesar 1,59 % (15.900 mg/L). Namun berbeda dengan penelitian Koda et al. (2017), yang menyatakan bahwa kandungan TOC yang terdapat pada IPL TPA yang berada di Polandia yaitu berkisar antara 129 mg/L – 437 mg/L. Hal ini disebabkan oleh sampah yang terdegradasi mengalami dekomposisi oleh bakteri dan mikroorganisme yang

menyebabkan terjadinya konversi senyawa organik menjadi karbon dioksida (CO₂) dan air. Sedimen pada lokasi tersebut memiliki tekstur yang kasar dan cenderung pasir sehingga tidak mengikat banyak bahan organik (Barus et al., 2020). Partikel sedimen dengan ukuran yang kecil memiliki kemampuan untuk mengikat bahan organik yang lebih kecil sebaliknya, partikel sedimen yang memiliki ukuran besar sulit untuk mengikat bahan organik (Arisa et al., 2014).



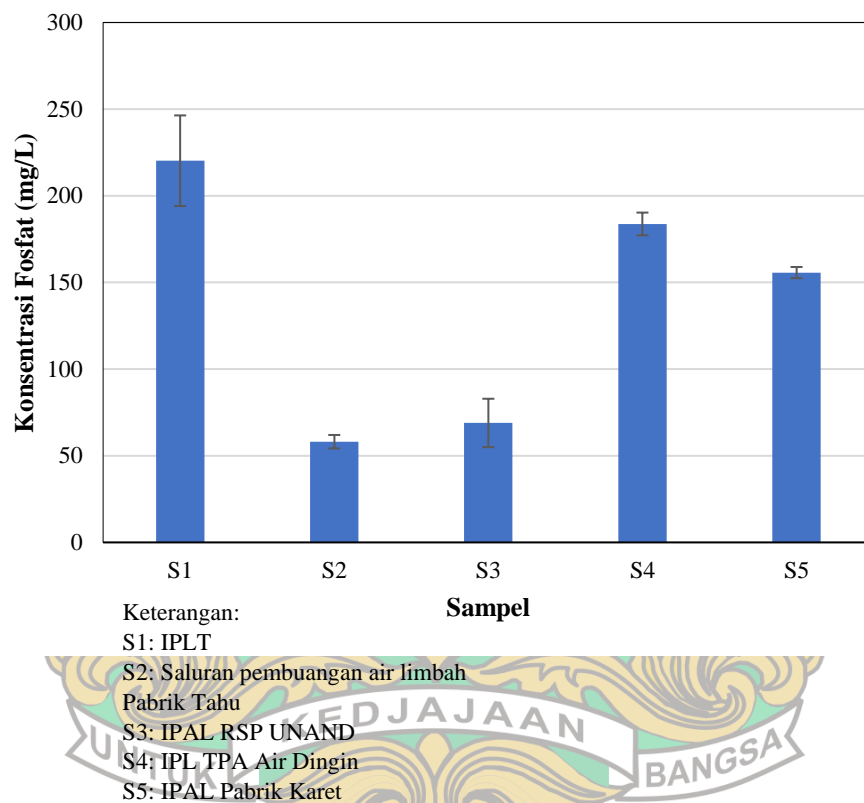
Keterangan:

- S1: IPLT
- S2: Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu
- S3: IPAL RSP UNAND
- S4: IPL TPA Air Dingin
- S5: IPAL Pabrik Karet

Gambar 4.3 Kandungan Amonium Sedimen

Pada **Gambar 4.3**, parameter yang diuji adalah amonium yang dilakukan pada kelima sampel. Dapat dilihat bahwa IPLT memiliki konsentrasi amonium yang tinggi yaitu sebesar 51,79 mg/L. Menurut Hilmi et al. (2022), Kandungan amonium yang terdapat pada IPLT yaitu 41,16 mg/L. Tingginya kandungan amonia pada IPLT dapat disebabkan oleh tingginya bahan organik yang berasal dari limbah domestik pembuangan tinja serta air seni. Kandungan amonium yang terendah terdapat pada IPL TPA Air Dingin yaitu 10,94 mg/L, sedangkan menurut Haslina et al. (2021), kandungan amonia yang terdapat pada IPL TPA berkisar antara 1,241 – 982 mg/L. Hal ini disebabkan oleh limbah yang terdapat pada IPL TPA Air Dingin merupakan limbah padatan, limbah rumah tangga, serta limbah industri

yang banyak mengandung senyawa organik lainnya sehingga kandungan amoniaknya jauh lebih rendah dibandingkan dengan IPLT (Rianto et al., 2021). Menurut Spasov et al. (2020), amonium merupakan sumber N yang dapat digunakan untuk oksidasi amonium menjadi nitrit dalam proses *comammox*. *Comammox Nitrospira* memiliki afinitas yang sangat tinggi terhadap amonium walaupun dalam konsentrasi amonium yang rendah (Kits et al., 2017). Karena afinitasnya yang tinggi terhadap amonium, populasi *comammox Nitrospira* biasanya lebih tinggi dibandingkan dengan mikroba pengoksidasi amonium lainnya pada kondisi oligotrofik (Lancaster et al., 2018).

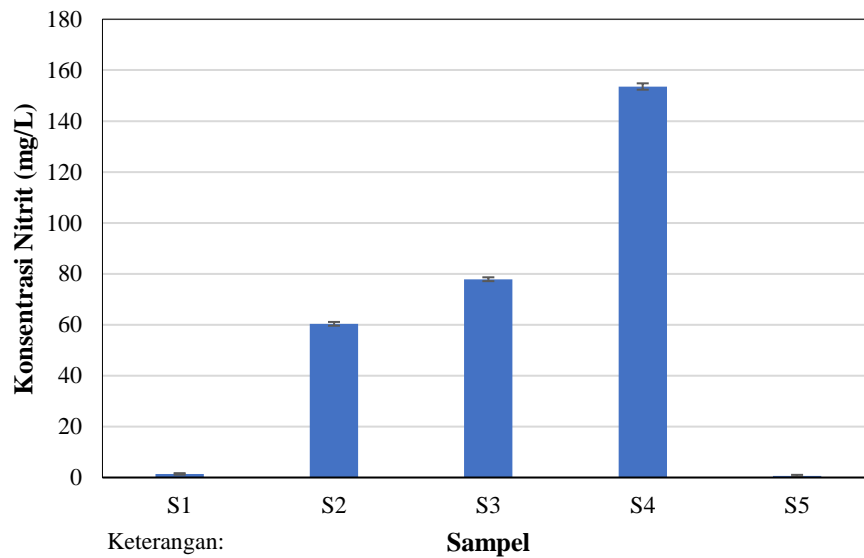


Gambar 4.4 Kandungan Fosfat Sedimen

Dalam pengujian fosfat pada 5 sampel yang ditunjukkan pada **Gambar 4.4**, dimana konsentrasi fosfat tertinggi dapat dilihat pada IPLT sebesar 220,20 mg/L, sedangkan menurut Ahmed et al. (2019), kandungan fosfat yang terdapat pada IPLT yaitu sekitar 187-296 mg/L. Tingginya nilai fosfat pada IPLT dapat disebabkan oleh banyaknya nutrisi yang terakumulasi pada lumpur tinja yang berasal dari makanan yang dikonsumsi (Rizqina et al., 2023). Tingginya kandungan fosfat pada IPLT

dapat disebabkan oleh fosfat organik yang terdapat dalam air buangan (tinja dan urin) serta sisa makanan. Fosfat pada tubuh manusia, ditemukan paling banyak pada tulang yaitu 85% dan sisanya 15% tersebar pada jaringan tubuh (N. C. Putri, 2015). Berdasarkan penelitian di atas, untuk konsentrasi fosfat terendah yaitu pada Saluran Pembuangan Pabrik Tahu sebesar 58,12 mg/L. Namun hasil ini berbeda dengan penelitian sebelumnya, dimana menurut Esti Mardiana, Eko Purwanto, (2014) kandungan fosfat pada saluran pembuangan pabrik tahu yaitu sebesar 20,32 mg/L. Fosfor memiliki peran penting terhadap komponen utama dalam pembentukan asam nukleat (DNA dan RNA), *fosfolipid* 117 (komponen utama membran sel), dan *Adenosin Trifosfat* (ATP), yang membentuk energi sehingga digunakan oleh sel untuk melakukan berbagai proses biologis. Ketersediaan fosfat memberikan pengaruh terhadap bakteri *comammox* yaitu untuk berkembang biak dan memperluas populasi mereka (Barus et al., 2020). Dengan demikian, perubahan dalam ketersediaan fosfat dapat memengaruhi kondisi lingkungan seperti pH, suhu, dan DO, yang berinteraksi dengan ketersediaan fosfat. Menurut Astuti et al. (2013) rendahnya nilai fosfat yang terdapat pada saluran pembuangan pabrik tahu dapat disebabkan oleh kondisi pH yang asam sehingga dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan bakteri *comammox*. *Nitrospira* dapat secara intraseluler menghasilkan amonia dari degradasi sianat atau urea dengan bantuan enzim sianase (Palatinszky et al., 2015). Pada sebagian besar mikroorganismenya, degradasi sianat dilakukan untuk mendetoksifikasi sianat atau memanfaatkannya sebagai sumber N pada proses nitrifikasi lengkap (Luque-Almagro et al., 2008).





Keterangan:

S1: IPLT

S2: Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu

S3: IPAL RSP UNAND

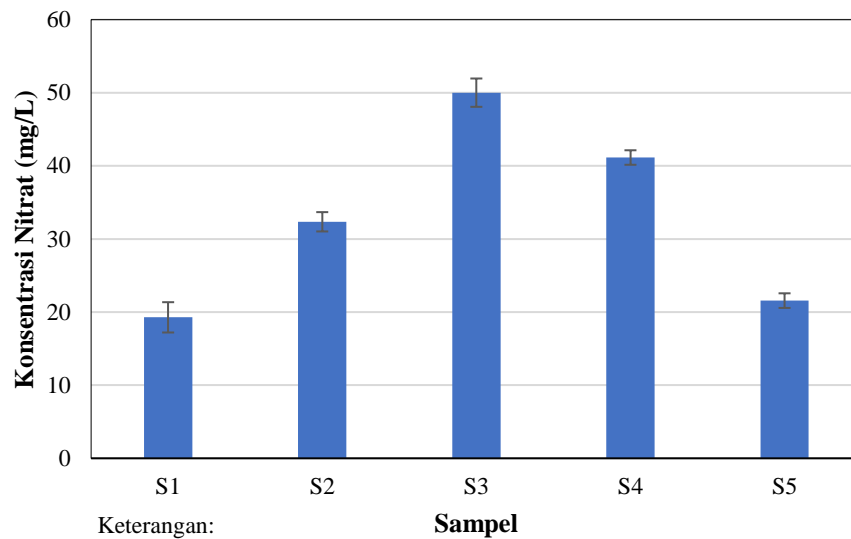
S4: IPL TPA Air Dingin

S5: IPAL Pabrik Karet

Gambar 4.5 Kandungan Nitrit Sedimen

Berdasarkan **Gambar 4.5**, konsentrasi nitrit tertinggi diperoleh pada IPL TPA Air Dingin yaitu sebesar 153,57 mg/L, menurut Dewi et al. (2017), kadar nitrit pada IPL TPA berkisar antara 25,579 – 25,904 mg/L. Tingginya kandungan nitrit tersebut dapat terjadi karena lambatnya proses nitrifikasi sehingga menyebabkan konsentrasi nitrit yang tinggi tidak dapat berubah menjadi nitrat. Hal ini disebabkan oleh kandungan oksigen yang rendah serta pH yang cenderung asam yang dapat membuat pertumbuhan bakteri nitrifikasi menjadi lambat. Tinggi atau pun rendahnya konsentrasi nitrit dapat dipengaruhi oleh kandungan oksigen terlarut (Rianto et al., 2021). Sedangkan pada pabrik karet, ketersediaan oksigen tidak memadai untuk melakukan proses nitrifikasi disebabkan oleh adanya akumulasi zat-zat kimia lainnya pada proses pengolahan di pabrik karet tersebut (Nainggolan et al. 2015). Untuk konsentrasi nitrit terendah yaitu pada IPAL Pabrik Karet sebesar 0,63 mg/L. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan (Aspelin & Ekholm, 2017) yaitu sebesar 0,05 – 44,9 mg/L. Hal ini dapat terjadi karena terhambatnya aktivitas mikroorganisme yang mengubah amonia menjadi nitrit sehingga langsung mengoksidasi amonia menjadi nitrat tanpa melalui proses nitrit (Aspelin & Ekholm, 2017). Menurut Kits et al. (2017), pada kultur *comammox Nitrospira*, meskipun

enzim nitrit oksidoreduktase (NXR) pada proses oksidasi nitrit sangat mirip dalam semua genom *Nitrospira*, namun afinitas nitrit pada *comammox* mengalami penurunan. Hal ini memungkinkan terjadinya konversi langsung dari amonium menjadi nitrat (NO_3^-) tanpa akumulasi nitrit sebagai produk antara dalam proses *comammox*.



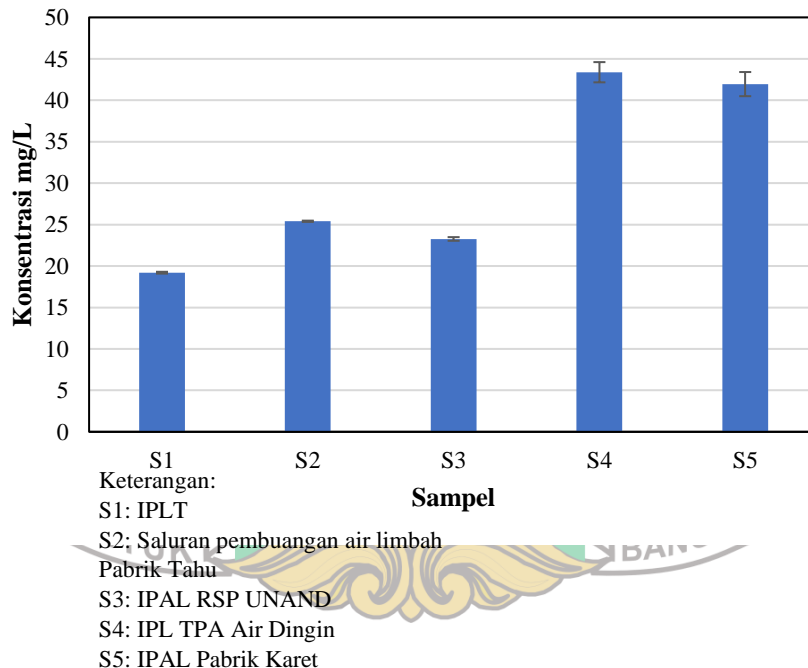
Keterangan:

- S1: IPLT
- S2: Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu
- S3: IPAL RSP UNAND
- S4: IPL TPA Air Dingin
- S5: IPAL Pabrik Karet

Gambar 4.6 Kandungan Nitrat Sedimen

Berdasarkan hasil pengujian nitrat pada **Gambar 4.6**, dapat dilihat bahwa konsentrasi nitrat tertinggi berada pada IPAL RSP UNAND yaitu 50,01 mg/L. Berdasarkan penelitian sebelumnya, menurut Sciences et al. (2015) dan Kempanapura et al. (2023) kandungan nitrat yang terdapat pada IPAL rumah sakit berkisar antara 12,8 – 26,5 mg/L. Hal ini disebabkan oleh adanya zat-zat kimia baik dari obat-obatan, disinfektan, serta limbah laboratorium rumah sakit. Sedangkan pada IPLT dikarenakan oleh rendahnya kadar oksigen yang terlarut dapat menyebabkan mikrob nitrifikasi sulit berkembang biak sehingga kadar nitrat pun berkurang (Rawis et al., 2022). Dalam proses *comammox*, nitrat (NO_3^-) merupakan produk akhir dari proses nitrifikasi lengkap (Gottshall et al., 2021). Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yang et al. (2024), dimana analisis regresi linier menunjukkan bahwa *comammox Nitrospira* berkorelasi positif dan

berbanding lurus dengan nitrat, dimana dengan meningkatnya nitrat menandakan adanya peningkatan pada kelimpahan bakteri *comammox Nitrospira*. Kadar nitrat pada IPAL RSP UNAND dapat berasal dari protein, darah, urin, produk pembersih, disinfektan, dan obat-obatan (Y. Luo et al., 2022). Sedangkan kandungan nitrat terendah berada pada IPLT sebesar 19,28 mg/L. Nilai kandungan nitrat ini masih termasuk ke dalam rentang 15 – 97 mg/L (Ahmed et al., 2019). Hal ini berhubungan dengan kandungan oksigen yang terlarut. Apabila oksigen yang dibutuhkan oleh suatu mikroorganisme mencukupi, maka dapat membantu proses pertumbuhan mikroorganisme tersebut. Dalam hal ini nitrat merupakan bagian dari proses nitrifikasi yang membutuhkan oksigen dalam proses oksidasi NH_3 menjadi NO_2 dan oksidasi NO_2 menjadi NO_3 . Menurut Rianto et al. (2021) kepekaan mikrob nitrifikasi terhadap rendahnya kadar oksigen terlarut dapat menyebabkan mikrob tersebut sulit untuk aktif berkembang biak.



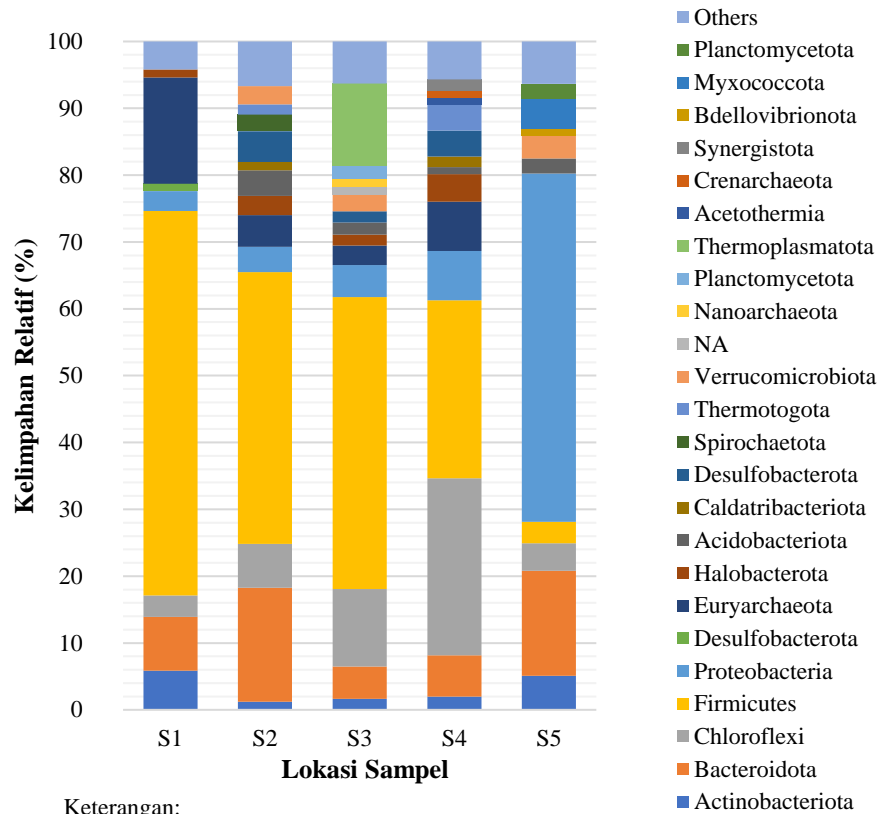
Gambar 4.7 Kandungan Sulfat Sedimen

Berdasarkan hasil pengujian sulfat pada **Gambar 4.7**, dapat dilihat bahwa konsentrasi sulfat tertinggi berada pada IPL TPA Air Dingin yaitu 43,38 mg/L. Berdasarkan penelitian sebelumnya, menurut Putri, (2019) kandungan sulfat yang terdapat pada IPL TPA sebesar 15,9 mg/L. Hal ini dapat disebabkan oleh tingginya hasil dekomposisi senyawa-senyawa organik seperti karbon, nitrogen, dan fosfor

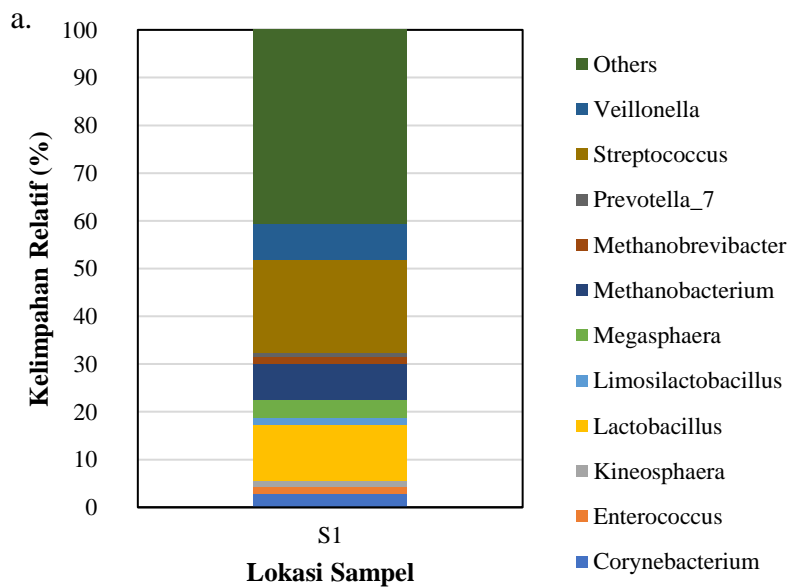
pada sampah oleh mikroorganisme. Selain itu reaksi sulfat dengan komponen organik dapat memengaruhi kandungan sulfat dalam sedimen, karena sulfat yang bereaksi dengan komponen organik dapat meningkatkan konsentrasi sulfat dalam sedimen (Ramadhanti, 2016). Kandungan sulfat yang terendah berada pada IPLT yaitu 19,19 mg/L. Hal ini berbeda dengan penelitian Haerani et al. (2022) dimana kandungan sulfat yang terdapat pada IPLT didapatkan sebesar 21 mg/L. Hal ini dapat terjadi karena sulfat yang bereaksi dengan senyawa organik sedikit sehingga terjadi penurunan konsentrasi sulfat pada sedimen (Martin, 2020). *Comammox Nitrospira* membutuhkan O₂ sebagai akseptor elektron terminal dan mengoksidasi berbagai substrat, seperti NH₃, H₂, format, dan NO₂⁻ (Maddela et al., 2022). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Koch et al. (2019), menemukan bahwa sulfat memiliki peran sebagai akseptor elektron alternatif dalam proses *comammox*.

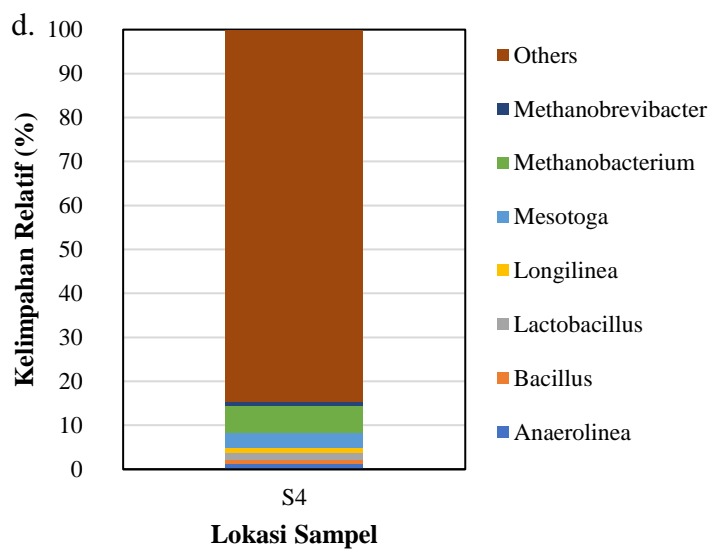
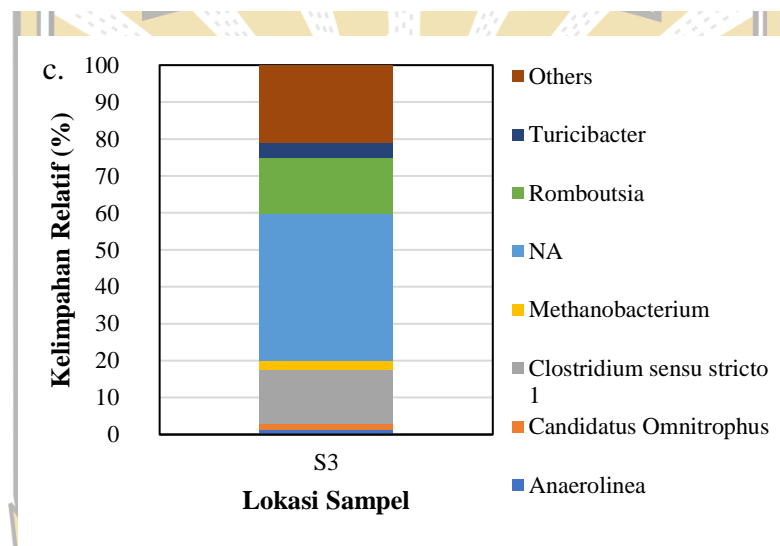
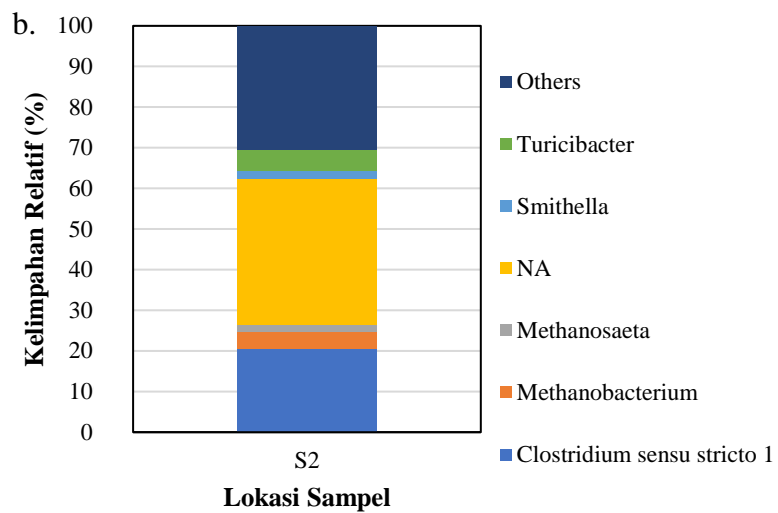
4.3 Analisis Komunitas Mikrob

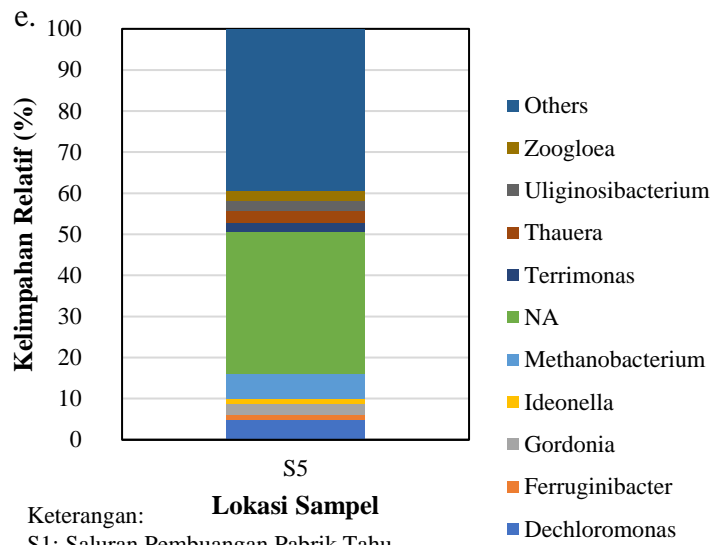
Pada penelitian ini, analisis sampel dengan menggunakan *Illumina Miseq Sequencing* telah dilakukan untuk menganalisis tingkat keragaman komunitas mikrob serta persentase masing-masing dari genus *Nitrospira* terhadap total bakteri pada sampel. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada *Illumina Miseq Sequencing*, diperoleh 7.961 ASV (*Amplicon Sequence Variant*) bakteri pada 5 lokasi pengambilan sampel yang diteliti, dengan 21 ASV termasuk ke dalam genus *Nitrospira*. *Amplicon Sequence Variant* (ASV) adalah istilah yang digunakan pada analisis sekuen DNA untuk mengidentifikasi variasi dalam sekuen gen tertentu, seperti gen 16S rRNA yang digunakan pada penelitian ini. Analisis sekuen dengan 16S rRNA ini dapat memberikan informasi filogeni yang mendalam dan memungkinkan penempatan bakteri pada klasifikasi taksonomi yang tepat. Berikut hasil kelimpahan relatif mikroorganisme tingkat filum serta genus Total Mikrob dan *Nitrospira* dapat dilihat pada **Gambar 4.8**, **Gambar 4.9** dan **Gambar 4.10**.



Gambar 4.8 Kelimpahan Relatif Total Mikrob pada Tingkat Filum. Kelimpahan yang <1% digabungkan ke dalam lainnya

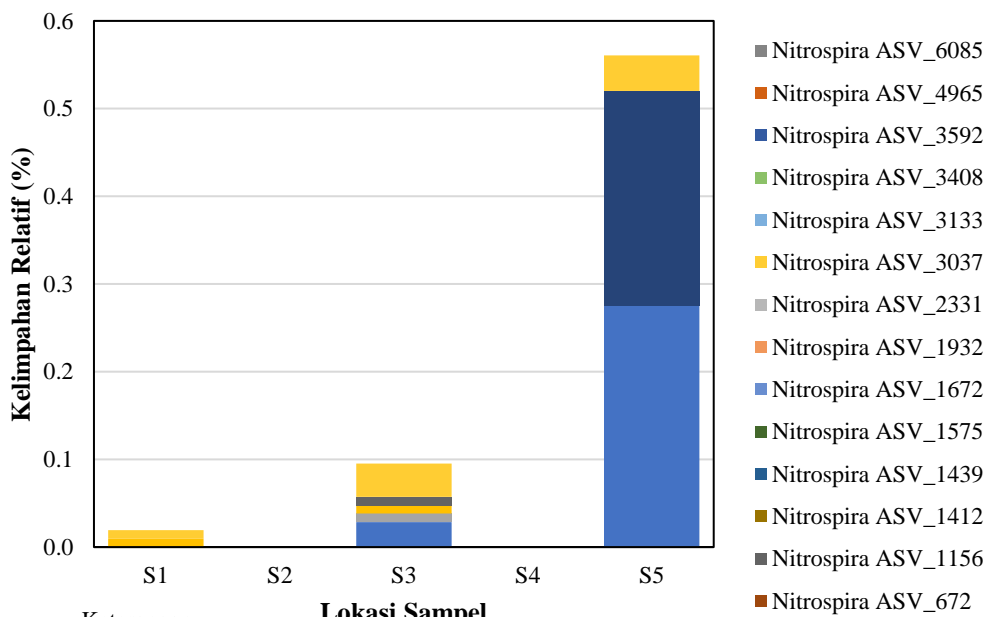






Keterangan: **Lokasi Sampel**
 S1: Saluran Pembuangan Pabrik Tahu
 S2: IPLT
 S3: IPAL RSP UNAND
 S4: IPL TPA Air Dingin
 S5: IPAL Pabrik Karet

Gambar 4.9 Kelimpahan Relatif Total Mikrob pada Tingkat Genus. Kelimpahan yang <1% digabungkan ke dalam lainnya, a. S1, b. S2, c. S3, d. S4, e. S5



Keterangan:
 S1: Saluran Pembuangan Pabrik Tahu
 S2: IPLT
 S3: IPAL RSP UNAND
 S4: IPL TPA Air Dingin
 S5: IPAL Pabrik Karet

Gambar 4.10 Kelimpahan Relatif Genus *Nitrospira*

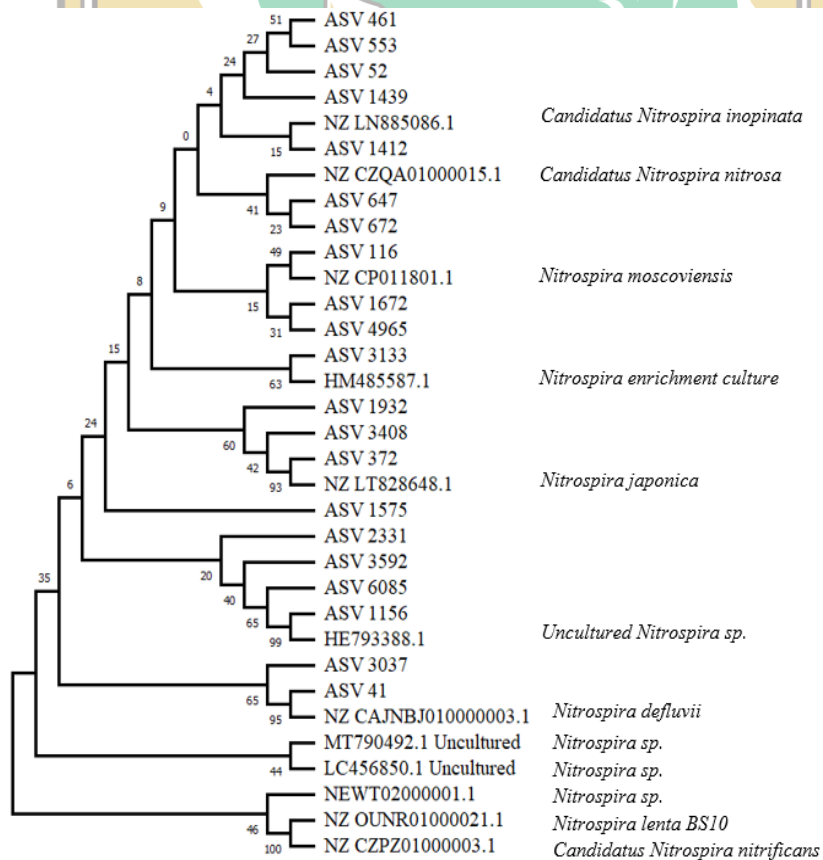
Pada **Gambar 4.8** dapat dilihat kelimpahan relatif pada tingkat filum terdiri dari *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, dan lain-lain. Filum tertinggi yang diperoleh yaitu *Firmicutes*. Pada **Gambar 4.9**, dapat dilihat kelimpahan relatif genus pada masing-masing lokasi sampel genus terbanyak yaitu pada lokasi Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu, IPLT, IPAL RSP UNAND, IPL TPA Air Dingin, dan IPAL Pabrik Karet adalah *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Methanobrevibacter*, dan *Limosilactobacillus*. Berdasarkan **Gambar 4.9**, genus dominan yang terdapat pada kelima lokasi sampel adalah *Methanobacterium*.

Berdasarkan grafik pada **Gambar 4.10** di atas, diketahui bahwa genus *Nitrospira* terdeteksi hampir tersebar di semua lokasi penelitian. Kelimpahan genus *Nitrospira* paling besar terdapat di IPAL Pabrik Karet dengan total kelimpahan sebesar 0,561%. Kelimpahan terbesar selanjutnya diikuti oleh IPAL RSP UNAND dan Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu dengan masing-masing kelimpahannya 0,10 % dan 0,02 %. Terdapat beberapa lokasi pada penelitian ini yang tidak ditemukannya genus *Nitrospira*, seperti IPLT dan IPL TPA Air Dingin. Hal ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Annavajhala et al. (2018), dimana *comammox Nitrospira* yang ditemukan pada IPAL industri yaitu sekitar 0,32 – 0,64%. Sedangkan pada lokasi IPL TPA dan IPLT bakteri yang ditemukan termasuk ke dalam genus *Bacillus spp*, dan *Staphylococcus* serta *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella* dan *Enterobacter* (Rahmadani et al., 2023). Bakteri-bakteri tersebut mengalami kompetisi dengan *comammox Nitrospira* dalam pertumbuhan dan perkembangannya sehingga mengakibatkan genus ini tidak terdeteksi di IPL TPA dan IPLT (Rokhim, 2022).

Adanya perbedaan tingkat keberagaman genus *Nitrospira* pada lokasi penelitian disebabkan oleh perbedaan pada ciri, karakteristik, serta komposisi lingkungan dimana bakteri tersebut hidup (Oktafia & Badruzsaufari, 2021). Analisis dengan *Illumina Miseq Sequencing* menghasilkan data sekuen pada masing-masing genus yang selanjutnya digunakan untuk penyusunan pohon filogeni. Penyusunan pohon filogeni dilakukan dengan mengambil sekuen 16S rRNA yang berasal dari bakteri pada 5 lokasi sampel. Dalam pemanfaatannya, 16S rRNA banyak digunakan

terutama dalam hal identifikasi. Pemanfaatan gen 16S rRNA untuk metode deteksi molekuler dianggap memiliki tingkat diskriminasi yang rendah karena sebagian besar hasil urutan DNA 16S rRNA menunjukkan adanya kesamaan yang tinggi di dalam satu spesies. Gen 16S rRNA memiliki keunggulan serta fungsi yang bersifat identik pada setiap organisme, dapat berubah sesuai jarak evolusinya sehingga dapat digunakan sebagai *kronometer* (penulis waktu) evolusi, memiliki bagian yang bersifat konservatif untuk konstruksi pohon filogeni universal, dan memiliki bagian *hyper variable* region yang memudahkan untuk mengidentifikasi jenis bakteri (Oktafia & Badruzsaufari, 2021).

Sekuen dari hasil *Illumina Miseq Sequencing* yang didapatkan yaitu berupa urutan basa nitrogen yang mengode suatu bakteri, sekuen bakteri hasil analisis ini dapat dilihat pada **Lampiran 3**. Kemudian sekuen ini yang digunakan pada penyusunan pohon filogeni. Hasil penyusunan pohon filogeni gen 16S rRNA dapat dilihat pada **Gambar 4.11** berikut.



Gambar 4.11 Pohon Filogeni dari Sekuen *comammox Nitrospira* pada Sampel Sedimen

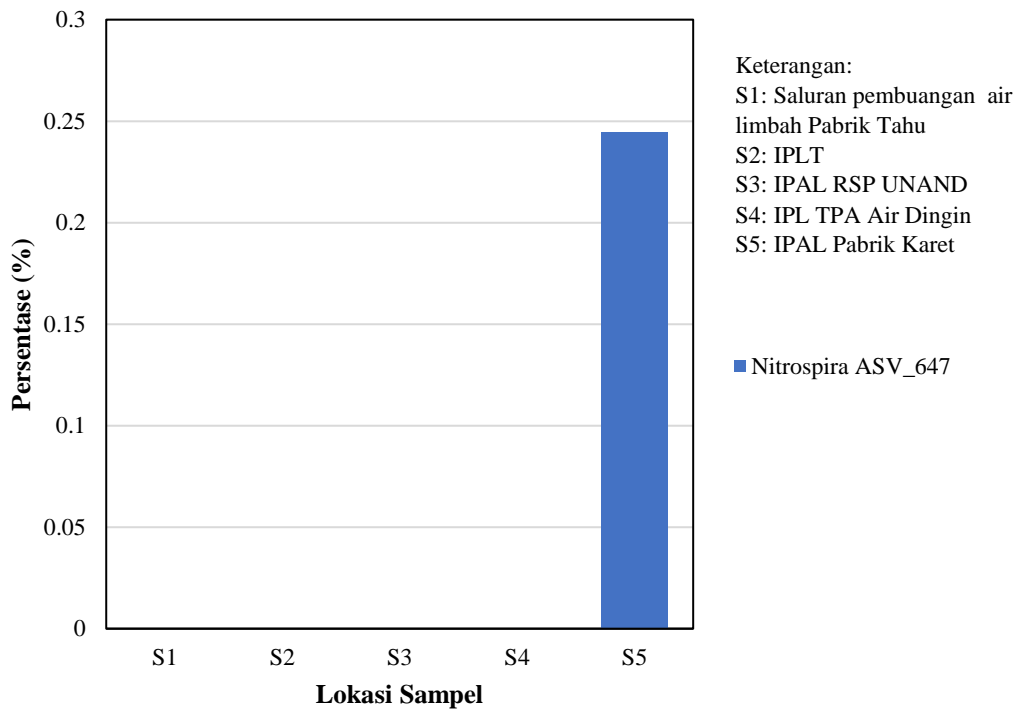
Berdasarkan **Gambar 4.11**, dapat diketahui bahwa ASV 1412 memiliki kekerabatan dengan spesies *Candidatus Nitrospira inopinata*. Untuk mengetahui spesies *Nitrospira* yang terdapat di lokasi pengambilan sampel, dilakukan analisis menggunakan BLAST untuk mencari kesamaan sekuen masing-masing genus. Sekuen hasil BLAST yang dipilih merupakan sekuen dengan persen identitas > 97,5%. Apabila pada homologi sekuen 16S rRNA menunjukkan hasil < 97,5% dapat dikatakan sebagai spesies yang berbeda dalam genus yang sama. Jika memiliki kemiripan 97%, suatu genus dapat dikatakan mirip dengan genus tersebut dan dikatakan satu spesies apabila memiliki kemiripan 99% (Petti, 2007). Persentase identitas bakteri yang telah dilakukan BLAST dapat dilihat pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2 Persentase Kelimpahan Sampel

Sampel	Spesies	Kelimpahan (%)
ASV 41	<i>Nitrospira defluvii</i>	4,182
ASV 116	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	1,178
ASV 372	<i>Nitrospira japonica</i>	0,499
ASV 647	<i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i>	0,245
ASV 672	<i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i>	0,465
ASV 1156	<i>Uncultured Nitrospira sp.</i>	0,118
ASV 1412	<i>Candidatus Nitrospira inopinata</i>	0,113
ASV 3037	<i>Nitrospira defluvii</i>	0,038
ASV 3133	<i>Nitrospira enrichment culture</i>	0,178

Berdasarkan **Tabel 4.2** di atas, dapat dilihat bahwa spesies yang terdeteksi yaitu *Nitrospira lenta*, *Candidatus Nitrospira inopinata*, *Candidatus Nitrospira defluvii*, *Nitrospira moscoviensis*, dan *Nitrospira japonica*. Berdasarkan penelitian Lawson & Lücker (2018), Oktafia & Badruzsaufari (2021) spesies *Nitrospira* yang termasuk dalam kelompok *comammox* terdiri atas *Candidatus Nitrospira nitrosa*, *Candidatus Nitrospira nitrificans*, *Candidatus Nitrospira inopinata* dan *Nitrospira sp. Strain Ga0074138*. Setelah disesuaikan dengan analisis filogeni yang dilakukan, didapatkan bahwa bakteri ASV 1412 dan ASV 647 termasuk ke dalam genus *Candidatus Nitrospira inopinata* dan *Candidatus Nitrospira nitrosa*. Genus *Candidatus Nitrospira nitrosa* yang terdapat pada lokasi IPAL Pabrik Karet. Hal ini dapat terjadi karena pada proses pengolahan karet tersebut menghasilkan limbah yang banyak mengandung senyawa organik. Pada proses pengolahan limbah yang

dilakukan pada lokasi pabrik karet memanfaatkan aktivitas mikroba untuk menguraikan zat organik yang terdapat pada air limbah dengan melibatkan bakteri nitrifikasi (Nainggolan et al., 2015). Persentase dan lokasi penelitian yang terdapat *Candidatus Nitrospira nitrosa* dapat dilihat pada **Gambar 4.11** dan **Tabel 4.3** berikut.



Gambar 4.12 Persentase *Candidatus Nitrospira nitrosa*

Tabel 4.3 Lokasi Temuan *Candidatus Nitrospira nitrosa*

ASV	Lokasi	Kelimpahan
ASV 647	IPAL Pabrik Karet	0,245%

4.4 Analisis Parameter Fisikokimia yang terkait dengan Kelimpahan *Comammox*

Parameter fisikokimia pada masing-masing lokasi yang teridentifikasi *comammox* dapat dilihat pada **Tabel 4.4**

Tabel 4.4 Hasil Analisis Parameter Fisikokimia yang terkait dengan Kelimpahan *Comammox*

Lokasi	TOC (%)	pH sedimen	Fosfat (mg/L)	Amonium (mg/L)	Nitrit (mg/L)	Nitrat (mg/L)	Sulfat (mg/L)	Kelimpahan <i>Comammox</i> (%)
IPLT	8.47	5.50	220.20	51.79	1.40	19.28	19,19	0.00
Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	5.38	5.40	58.12	27.07	60.37	32.36	25,40	0.00
IPAL RSP UNAND	15.14	5.80	68.94	34.39	77.88	50.01	23,26	0.00
IPL TPA Air Dingin	1.59	5.20	183.76	10.95	153.58	41.14	43,38	0.00
IPAL Pabrik Karet	5.70	5.10	155.71	21.77	0.63	21.57	41,95	0.245

Berdasarkan **Tabel 4.4**, dapat dilihat bahwa bakteri *comammox* ditemukan pada sistem buatan di IPAL Pabrik Karet yaitu sebesar 0,245%. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Wang et al. (2018) dan Zhao et al. (2019) yang menyatakan bahwa *Nitrospira nitrosa* merupakan spesies *comammox* yang paling melimpah di IPAL Industri perkotaan.

Organisme *comammox* yang teridentifikasi sampai saat ini yaitu *Candidatus Nitrospira nitrosa*, *Candidatus Nitrospira nitrificans*, *Candidatus Nitrospira inopinata*, dan *Nitrospira sp. strain Ga0074138* yang memiliki enzim *Ammonia monooxygenase* (AMO), *Hydroxylamine oxidoreductase* (HAO), dan *Nitrite oxidoreductase* (NXR) sendiri (Sobotka et al., 2018). Berdasarkan **Gambar 4.12** dapat dilihat bahwa pada penelitian ini bakteri *comammox* yang diidentifikasi adalah spesies *Candidatus Nitrospira nitrosa*.

Hasil pH yang ditunjukkan pada penelitian ini memiliki peran penting dalam mendukung keberadaan *comammox*. Nilai pH yang terdeteksi pada lokasi penelitian ini berkisar antara 5,5 – 5,8. Hal ini menunjukkan bahwa pH memiliki hubungan yang berbanding terbalik terhadap keberadaan *comammox*, dimana apabila pH meningkat maka kelimpahan *comammox* akan menurun. Salah satu faktor lingkungan yang memiliki pengaruh terhadap keberadaan *comammox Nitrospira* adalah pH. Menurut Hu & He, (2017) keberadaan dari bakteri *comammox*

dipengaruhi oleh pH. Pada umumnya, *comammox Nitrospira* dapat ditemukan pada lingkungan yang memiliki nilai pH berkisar antara 7,0 – 8,0, karena pada pH ini enzim seperti amonia *monooksigenase* serta *hidroksilamin dehidrogenase* bekerja secara optimal untuk proses konversi nitrogen (Blum et al., 2018). Kelimpahan *comammox Nitrospira* juga dapat ditemukan pada lingkungan dengan nilai pH sebesar 3 – 4. Hal ini menunjukkan bahwa adanya kemungkinan *comammox* beradaptasi pada pH yang rendah (Takahashi et al., 2020). Pengaruh nilai pH terhadap keberadaan *comammox Nitrospira* tergantung pada faktor lingkungan. Selain itu, perubahan pH memberikan pengaruh pada bakteri *comammox*, apabila nilai pH lingkungan terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat mengakibatkan terhambatnya aktivitas bakteri *comammox*.

Menurut Sun et al. (2020), TOC memiliki pengaruh terhadap keberadaan *comammox Nitrospira*. Pada penelitian ini, nilai TOC yang didapatkan berada pada rentang 1,59% - 15,14%. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sun et al. (2020), menerangkan bahwa aktivitas *comammox* optimal pada kadar TOC rendah yaitu 0,24% - 3,18%. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian yang dilakukan pada lokasi IPL TPA Air Dingin memiliki nilai TOC yang sesuai dengan penelitian Sun et al. (2020). Tetapi, untuk lokasi penelitian pada IPLT, saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu, IPAL RSP UNAND, dan IPAL Pabrik Karet memiliki nilai TOC yang berbeda yaitu pada rentang 1,59% - 15,14%. Pada lokasi dengan kadar TOC yang relatif rendah bakteri *comammox* dapat ditemukan.

TOC merupakan parameter untuk mengukur jumlah karbon organik yang terlarut dalam air, sedimen dan tanah. TOC menyediakan sumber karbon organik untuk pertumbuhan dan metabolisme pada mikroorganisme, termasuk *comammox* (Shi et al., 2020). Kelarutan amonia pada sistem buatan dapat dipengaruhi oleh TOC dimana, karbon organik dapat membentuk kompleks dengan amonia dan dapat mengurangi ketersediaan amonia untuk *comammox* sehingga membuat amonia lebih susah diakses oleh *comammox* (Zhang et al., 2021). Ketersediaan oksigen yang diperlukan oleh *comammox* dapat dipengaruhi oleh TOC. Pengaruh kandungan TOC terhadap kelimpahan *comammox* tergantung pada kondisi lingkungan tertentu (Liu et al., 2020).

Menurut Daims et al. (2016) apabila *comammox* tidak melepaskan nitrit sebagai perantara dalam proses nitrifikasi lengkap, maka konsentrasi nitrit biasanya akan rendah pada suatu lingkungan atau sistem. *Comammox Nitrospira* tidak memiliki gen untuk proses reduksi asimilasi nitrit yang telah menyebabkan kehilangan potensi untuk menggunakan sumber nitrogen nitrit eksternal (Palomo et al., 2018). Nitrit bukanlah substrat yang dibutuhkan oleh *comammox Nitrospira* untuk metabolit akhir pada proses nitrifikasi (Sun et al., 2020). Namun, dengan tingginya konsentrasi nitrit pada suatu lingkungan atau sistem dapat memberikan sumber nitrogen yang cukup untuk bakteri *comammox*. Pada kondisi ini, *comammox Nitrospira* dapat berkembang dengan baik serta memiliki kemampuan dalam mengoksidasi amonia menjadi nitrat. Pertumbuhan serta aktivitas *comammox Nitrospira* didukung oleh konsentrasi nitrit yang tinggi. Apabila konsentrasi nitrit rendah maka bakteri *comammox* akan mengalami keterbatasan nitrogen (Hu & He, 2017b). Konsentrasi nitrit yang rendah dapat menyebabkan *comammox* bersaing dengan mikroorganisme lain untuk mendapatkan sumber nitrogen yang sama. Pertumbuhan bakteri *comammox* pada konsentrasi yang berbeda tergantung pada jenis dan varietasnya. Beberapa jenis *comammox* dapat lebih toleran terhadap konsentrasi nitrit rendah, sedangkan yang lain memerlukan konsentrasi yang lebih tinggi (Sun et al., 2020). Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan yaitu pada kadar nitrit yang rendah terdeteksi bakteri *comammox* pada lokasi IPAL Pabrik Karet.

Adanya penurunan nitrit dan nitrat, dapat menyebabkan terjadinya hambatan pada keberlangsungan hidup *comammox*, karena pada lingkungan yang memiliki amonium, nitrit, dan nitrat yang rendah, bakteri *comammox* cenderung lebih kompetitif terhadap mikroorganisme lainnya.

Fosfat memiliki korelasi positif terhadap keberadaan *comammox Nitrospira*, namun korelasi tersebut cenderung lemah, dikarenakan oleh bakteri *comammox* tersebut terjadi pada proses nitrifikasi pada siklus nitrogen (Wang et al., 2022). Fosfor (P) yang tersedia pada sedimen memiliki efek signifikan pada komunitas *comammox Nitrospira*. Penelitian sebelumnya juga menemukan bahwa P merupakan faktor penting yang membentuk komunitas pengoksidasi amonia kanonik (Chu et al., 2007; K. Yang et al., 2020) dan *comammox Nitrospira* (Wang et al., 2019). P sangat

penting untuk pertumbuhan mikrob, karena RNA yang kaya P membutuhkan P untuk mensintesis protein (He & Dijkstra, 2015). Akumulasi P akan mempercepat mineralisasi N dan menyediakan lebih banyak energi untuk biomassa mikrob (Tang et al., 2016). Oleh karena itu, P dapat secara tidak langsung memengaruhi oksidator amonia dengan mengatur ketersediaan N.

Ion sulfat merupakan sejenis anion poliatom dengan rumus SO_4^{2-} yang terdiri dari atom pusat sulfur dikelilingi oleh empat atom oksigen dalam susunan tetrahedron. Ion sulfat bermuatan negatif dua dan merupakan basa konjugat ion hidrogen sulfat (bisulfat), HSO_4^- , yaitu besi konjugat asam sulfat, H_2SO_4 . Tingginya kandungan sulfat pada kelima lokasi sampel dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti aktivitas manusia, kualitas perairan, serta faktor lingkungan (Hadiarti, 2015). Dalam hal ini ion sulfat bertindak sebagai oksidator yang menyumbangkan oksigen dalam proses *comammox* yang terjadi di kelima lokasi sampel (Zhang et al., 2020).

Dalam menentukan keanekaragaman dan spesies dari *comammox* sebagai jenis bakteri pengoksidasi amonia yang baru ditemukan pada berbagai lingkungan penting untuk memahami kontribusinya terhadap siklus nitrogen.

4.5. Faktor Lingkungan Utama yang Memengaruhi Kelimpahan Bakteri *Comammox*

Menurut Mehrani et al. (2020), kelimpahan bakteri *comammox Nitrospira* dalam proses penyisihan nitrogen yang terjadi pada IPAL berhubungan dengan beberapa parameter penting seperti pH, suhu, DO, dan konsentrasi nitrogen. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Ye et al. (2024) menunjukkan bahwa kelimpahan bakteri *comammox* memiliki korelasi dengan NH_4^+ -N dan NO_3^- -N, yang merupakan substrat dan produk nitrifikasi, dan konsentrasinya dapat secara langsung memengaruhi pertumbuhan bakteri *comammox*. Selain suhu, pH dan kandungan TN, salinitas juga terdeteksi berkorelasi dengan kelimpahan bakteri *comammox*. Namun hal ini tidak sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Ye et al. (2024), di mana kelimpahan bakteri *comammox* terbanyak yang didapatkan berada pada daerah yang mengandung fosfat yang cukup tinggi. Berikut parameter lingkungan yang dapat memengaruhi keberadaan *comammox*:

a. Kandungan Nitrogen

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mehrani et al. (2022), oksidasi amonia lengkap memainkan peran penting (18%) pada tahap awal percobaan skala laboratorium, sedangkan pada tahap pertengahan hingga akhir, *comammox* hanya memiliki peran kecil sebesar 25% sebagai jalur konversi $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Rendahnya kelimpahan bakteri yang didapatkan disebabkan oleh tingginya kandungan amonium dengan SRT yang sangat pendek. Dominasi bakteri *comammox* normalnya terjadi pada konsentrasi nitrit yang rendah dengan SRT yang panjang (>40 hari) dengan amonium yang rendah (<15 mg N/L) serta kondisi DO yang rendah (<0,5 mg $\text{O}_2\text{/L}$).

Secara eksperimental, Mehrani et al. (2022) menyatakan bahwa $\text{NH}_4^+\text{-N}$ dikonsumsi oleh *comammox*, sementara $\text{NO}_3^-\text{-N}$ secara bersamaan diproduksi dengan rasio $\text{NO}_3^-\text{-N}/\text{NH}_4^+\text{-N}$ hampir 1:1. Di sisi lain, akumulasi $\text{NO}_2^-\text{-N}$ sementara yang dihasilkan oleh *comammox Nitrospira* selama oksidasi $\text{NH}_4^+\text{-N}$ sebagai akibat dari transit ekstraseluler selama nitrifikasi lengkap. Berbeda dengan nitrifier lainnya, *comammox Nitrospira* yang diketahui saat ini tidak dapat tumbuh hanya $\text{NO}_2^-\text{-N}$ yang disebabkan oleh rendahnya afinitas nitrit (Koch et al., 2019).

Menurut Yin et al. (2011), komunitas bakteri *comammox* dipengaruhi secara signifikan oleh $\text{NO}_2^-\text{-N}$. Struktur komunitas bakteri *comammox* pada tanah dan sedimen dalam suatu sistem yang sama memiliki kedekatan satu sama lain. Yin et al. (2011), menyatakan bahwa di dalam tanah, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ terbukti berasosiasi secara signifikan dengan komunitas bakteri *comammox*, serta menyebabkan pengaruh yang sangat signifikan terhadap komposisi komunitas bakteri *comammox*. Selain itu $\text{NH}_4^+\text{-N}$ secara signifikan memengaruhi distribusi komunitas bakteri *comammox* pada IPAL. Hal ini disebabkan oleh bakteri *comammox* yang kompetitif terhadap $\text{NH}_4^+\text{-N}$ pada sedimen di sistem buatan seperti IPAL, IPLT, dan IPL TPA.

b. Fosfat

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Liu et al. (2024), menyatakan bahwa terdapat hubungan negatif antara fosfat dengan bakteri *comammox*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *comammox* tidak menyukai lingkungan dengan fosfat yang tinggi. Namun, menurut (Sun et al., 2019) bakteri

comammox Nitrospira lebih menyukai lingkungan dengan konsentrasi P yang lebih tinggi. Dimana dengan penambahan P dapat meningkatkan mineralisasi N dan meningkatkan ketersediaan substrat untuk komunitas bakteri *comammox Nitrospira*.

Menurut Xie et al. (2023), menjelaskan bahwa bakteri *comammox* mungkin dapat beraktivitas pada keadaan amonium yang lebih sedikit serta *comammox* dapat lebih baik beradaptasi pada lingkungan dengan kandungan amonium yang lebih rendah. Fosfat merupakan sumber energi penting yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri *comammox* serta ketersediaannya dapat memberikan pengaruh terhadap bakteri *comammox* yaitu untuk berkembang biak dan memperluas populasi mereka (Barus et al., 2020).

c. DO

Dominasi bakteri *comammox* dibandingkan dengan nitrifier lainnya yang diamati pada sistem penyisihan N berada pada kondisi DO yang terbatas ($DO < 0,5 \text{ mg O}_2/\text{L}$) (Mehrani et al., 2022). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Koch et al. (2019), dimana *comammox Nitrospira* menunjukkan keunggulan kompetitif pada konsentrasi O_2 terlarut yang rendah.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Luo et al. (2022), bakteri *comammox* memiliki keunggulan dibandingkan dengan bakteri nitrifikasi konvensional pada substrat oligotrofik, yaitu dapat tumbuh pada kondisi amonium serta DO yang rendah. Hal ini sejalan dengan Chao et al. (2016) yang menyatakan bahwa pada biofilm dalam reaktor aerobik dengan konsentrasi DO yang rendah dapat menginduksi pertumbuhan bakteri *comammox*. Menurut Sobotka et al. (2018) berdasarkan studi *cross-section* mengenai distribusi massa dalam sistem biofilm nitrifikasi ditemukan bahwa kelimpahan serta pertumbuhan yang cepat pada *comammox Nitrospira* dibandingkan dengan NOB pada ketersediaan DO yang lebih sedikit. Hal ini menyatakan bahwa *comammox Nitrospira* secara implisit beradaptasi lebih baik pada kondisi DO terbatas.

d. pH

Menurut Takahashi et al. (2020), bakteri *comammox* paling dominan dalam keadaan sedimen yang bersifat asam pada pH 4,0-7,0 dibandingkan dengan

komunitas bakteri nitrifikasi lainnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Daims et al. (2015) memperoleh isolat *comammox* yaitu *Nitrospira inopinata* dari biofilm yang telah disimpan dalam air panas pada pH 7,5. Menurut Van Kessel et al. (2015) yang melakukan percobaan pada biofilter sistem akuakultur resirkulasi dalam *reactor batch sequencing* yang dioperasikan pada pH 6,9 diperoleh bakteri *comammox* yaitu *Candidatus Nitrospira nitrosa* dan *Candidatus Nitrospira nitrificans*. Hal ini sejalan dengan pendapat Daebeler et al. (2023), yang melakukan percobaan inkubasi dengan pH yang dikontrol menunjukkan *comammox* dapat tumbuh pada pH 7,6.

Takahashi et al. (2020) melakukan percobaan mengenai adaptasi terhadap perubahan pH pada aktivitas nitrifikasi sampel dari bioreaktor yang diberi amonium dan diuji pada berbagai nilai pH. Berdasarkan penelitian tersebut didapatkan pada rentang nilai pH 6,4-9,0 NH_3 tidak sepenuhnya teroksidasi menjadi NO_2^- . Pada kondisi pH yang lebih tinggi ($\text{pH} > 9,0$), konsentrasi NH_3 mengalami peningkatan karena deprotonasi, sehingga dapat menghambat aktivitas bakteri *comammox* untuk berkembang biak.

Comammox Nitrospira inopinata merupakan salah satu spesies *comammox* kultur murni yang tersedia jarang terdeteksi dalam sistem pengolahan air limbah (Zheng et al., 2023). Dengan demikian, bakteri *comammox* yang ditemukan pada penelitian ini adalah *Nitrospira nitrosa* yang dominan pada lokasi IPAL industri.

Berdasarkan hal di atas dapat dilihat bahwa keberadaan dan pertumbuhan bakteri *comammox* dapat beradaptasi dalam lingkungan dengan parameter fisikokimia seperti kandungan nitrogen, fosfat, DO, serta pH yang beragam.

4.6 Penyebaran Populasi dan Komunitas *Comammox Nitrospira*

Comammox Nitrospira pertama kali ditemukan oleh Daims et al. (2015) dan Van Kessel et al. (2015) pada IPAL dan juga spesies lainnya seperti *comammox Nitrospira clade A* ditemukan juga oleh Pjevac et al. (2017) pada IPAL yang sama. Namun bakteri *comammox Nitrospira inopinata* yang ditemukan memiliki kelimpahan yang relatif rendah pada lokasi IPAL (Chao et al., 2016). Menurut Fan et al. (2017) yang melakukan penelitian terhadap lumpur aktif pada sistem IPAL

diperoleh hasil bakteri *comammox Nitrospira* dengan jumlah yang sedikit. Hal ini sesuai dengan pendapat Pan et al. (2018), yang menyatakan bahwa *comammox Nitrospira* tidak ditemukan dalam jumlah besar di IPAL pada musim dingin

Sebaliknya pada penelitian Wang et al. (2018) menemukan bahwa *comammox Nitrospira* relatif lebih banyak pada lumpur aktif di beberapa IPAL. *Comammox Nitrospira* juga telah ditemukan pada studi tentang penyisihan nutrisi biologis skala besar pada IPAL oleh Annavajhala et al. (2018), yang menunjukkan bahwa *comammox Nitrospira* dapat berperan dalam proses nitrifikasi di IPAL.

Pada skala laboratorium pengembangan *comammox Nitrospira* yang juga merupakan nitrifier dominan pada proses nitrifikasi dilakukan oleh Camejo et al. (2017), dan hasil yang didapatkan yaitu *comammox Nitrospira* dapat terdeteksi pada sampel lumpur aktif yang berasal dari IPAL dengan kadar oksigen terlarut rendah dan merupakan spesies *Candidatus Nitrospira nitrosa* (Keene et al., 2017; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2019). Selain itu menurut Zheng et al. (2019) telah ditemukan keberadaan *comammox amoA* pada enam dari delapan sampel yang berasal dari IPAL. Sebagian besar spesies yang ditemukan adalah *Candidatus Nitrospira nitrosa* yang mungkin merupakan kelompok dominan dari *comammox Nitrospira* yang ditemukan pada IPAL dengan konsentrasi amonium yang relatif tinggi. *Comammox Nitrospira* telah terdeteksi pada beberapa bagian IPAL, salah satunya pada kolam aerasi dengan konsentrasi amonium yang relatif lebih tinggi (Spasov et al., 2020).

Menurut Spasov et al. (2020), *comammox Nitrospira* merupakan pengoksidasi amonia dominan yang mampu melakukan oksidasi amonia secara sempurna. Secara keseluruhan, kelimpahan yang relatif tinggi dan keragaman genetik dari *comammox Nitrospira* menjadikannya target ideal untuk melakukan upaya budidaya berkelanjutan.

4.7 Kontribusi Penemuan Bakteri *Comammox Nitrospira* terhadap Sistem Buatan

Penemuan bakteri *comammox* ini memiliki potensi yang dapat diaplikasikan dalam pengolahan limbah di IPAL. Menurut Nainggolan et al. (2015), pada IPAL pabrik karet terdapat limbah cair yang mengandung bahan organik dengan nitrogen yang

tinggi misalnya protein, amonia, dan fosfat. Amonia yang digunakan sebagai zat antikoagulan dalam proses pengolahan dapat menyebabkan kadar amonia tinggi pada air limbah tersebut. Kehadiran amonia terhadap suatu ekosistem dapat memengaruhi mikrob terutama bakteri yang mampu mendegradasi amonia. Dengan adanya kontaminasi dari amonia pada suatu ekosistem dapat meningkatkan perkembangan populasi bakteri pendegradasi amonia.

Dalam limbah cair karet terdapat bakteri yang berpotensi mendegradasi senyawa amonia. Bakteri tersebut diperoleh dengan mengisolasi langsung dari limbah cair karet yang kemudian dikembangbiakkan serta dimanfaatkan untuk penanganan pengolahan limbah secara biologi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Nainggolan et al. (2015), diperoleh bahwa karakteristik serta morfologi dari mikrob dengan genus yang berbeda yaitu *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira* dan *Nitrococcus* mampu tumbuh pada lingkungan yang mengandung kadar amonium yang cukup tinggi. Beberapa faktor lingkungan yang dapat memengaruhi pertumbuhan bakteri pendegradasi amonia diantaranya suhu, pH, dan amonium. Menurut Fawwaz et al. (2024), penguraian amonium oleh bakteri nitrifikasi berada pada rentang suhu 25 – 35°C. Namun jika suhu pertumbuhannya mengalami peningkatan dan berada di atas 50°C, maka bakteri nitrifikasi akan berhenti untuk melakukan proses penguraian amonium. Pada pH 5,5 – 10, siklus pertumbuhan bakteri nitrifikasi akan berjalan dengan baik. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Nainggolan et al. (2015). Namun, pada pH di bawah 5, pertumbuhan bakteri nitrifikasi menjadi terhambat bahkan dapat membunuh mikrob tersebut.

Bakteri pengoksidasi amonium merupakan bakteri aerob yang membutuhkan oksigen serta menjadi salah satu faktor penting dalam proses pertumbuhan. Tidak adanya oksigen terlarut dapat menyebabkan tingginya konsentrasi BOD pada suatu sistem sehingga menyebabkan tidak adanya pertumbuhan bakteri pendegradasi amonium tersebut. DO merupakan hal yang dibutuhkan oleh bakteri dalam proses pertumbuhan dan metabolisme serta sebagai oksidasi bahan-bahan organik dan anorganik dalam proses aerobik. Bakteri nitrifikasi memanfaatkan amonia sebagai sumber energi dan pembentukan sel. Menurut Nainggolan et al. (2015) kadar

amonium tertinggi terdapat pada bak pengendapan III yaitu 20,5 mg/L. Peningkatan konsentrasi amonia ini sebagai akibat proses dekomposisi (amonifikasi) bahan-bahan organik yang berasal dari sisa hasil pengolahan karet dan apabila proses nitrifikasi tidak berlangsung baik maka akan terjadi akumulasi amonia pada bak pengolahan. Apabila mengalami kelebihan kandungan amonium, maka bakteri nitrifikasi tidak terionisasi sehingga dapat menyebabkan toksisitas terhadap bakteri tersebut dan menghambat proses nitrifikasi. Pada bak lainnya, kadar amonium yang terdeteksi cukup rendah yaitu berkisar antara 0,323 mg/L dan 5,24 mg/L, hal ini dapat terjadi karena penggunaan soda api dan tawas dalam jumlah banyak pada proses pengolahan sebagai bahan netralisasi keasaman limbah dan kandungan amonium, yang menyebabkan tidak adanya sumber energi utama untuk pertumbuhan yang diperlukan oleh bakteri nitrifikasi. Genus bakteri yang ditemukan oleh Nainggolan et al. (2015) pada bak pengendapan I dan II yaitu *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrospira* dan *Nitrococcus* yang dapat tumbuh meskipun kondisi kadar amonium yang terbatas. Hal ini disebabkan oleh ketersediaan senyawa organik yang banyak dalam limbah serta kondisi lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhannya. Tersedianya senyawa organik dan substrat yang cukup juga berperan dalam peningkatan jumlah bakteri dalam limbah (Ruscalleda Beylier et al., 2019).

Menurut Lawson & Lücker, (2018) oksigen merupakan faktor kunci lain yang dapat memengaruhi metabolisme *comammox Nitrospira*, yang ditemukan bertahan dan berkembang biak di lingkungan dengan DO rendah dalam penelitian sebelumnya. Namun, dalam penelitian ini DO dalam sistem pengolahan air limbah memiliki pengaruh terhadap bakteri *comammox* hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya (Beach & Noguera, 2019). Perlu dicatat bahwa berbagai faktor yang memengaruhi dalam IPAL mungkin bersama-sama memainkan peran penting dalam memengaruhi diferensiasi aktivitas dan komposisi komunitas dari mikrob tersebut.

Di masa depan, diharapkan untuk terus mengeksplorasi efek serta pengaruh dari berbagai faktor lingkungan terhadap mikroorganisme oksidasi atau nitrifikasi amonia. Oleh karena itu, penambahan pada parameter lingkungan lainnya dalam mengetahui hubungannya dengan bakteri *comammox* dapat ditambahkan sebagai

acuan untuk menyelidiki keberadaan mikroorganisme pengoksidasi amonia yang terdapat pada area IPAL, IPLT, dan IPL TPA. Penelitian-penelitian di atas dapat memberikan ide-ide baru untuk mengeksplorasi kontribusi mikroorganisme pengoksidasi amonia serta faktor yang dapat memengaruhinya.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Rentang konsentrasi TOC yaitu berkisar antara 1,59 % -15,14 %; pH sedimen sebesar 5,1-5,8; fosfat 58,12 mg/L-220,20 mg/L; amonium 10,95 mg/L-51,79 mg/L; nitrit 0,63 mg/L-153,58 mg/L; dan nitrat 19,28 mg/L-50,01 mg/L; serta sulfat 19,19 mg/L-43,28 mg/L pada lokasi sampel sedimen IPAL, IPLT dan IPL TPA Kota Padang.
2. Bakteri *comammox* yang ditemukan di sistem buatan yaitu hanya terdapat pada lokasi sampel IPAL Pabrik Karet yaitu sebesar 0,245%, sedangkan pada IPAL RSP UNAND, saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu, IPLT, dan IPL TPA Air Dingin tidak ditemukan bakteri *comammox*, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kelimpahan bakteri *comammox* pada sistem buatan kota Padang memiliki karakteristik parameter fisikokimia terkait yaitu fosfat dengan konsentrasi sebesar 155,71 mg/L.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut:

1. Dalam pengambilan sampel dilakukan pada lokasi dengan karakteristik yang berbeda agar dapat dijadikan sebagai acuan serta perbandingan dalam memahami karakteristik lingkungan yang memengaruhi keberadaan *comammox*.
2. Dalam melakukan penelitiannya selanjutnya dapat ditambahkan parameter musim untuk melihat perbedaan musim pada lokasi yang sama untuk melihat kecenderungan terhadap kelimpahan bakteri *comammox*.
3. Melakukan perbandingan serta pengujian terhadap perbedaan kelimpahan *comammox* antar lokasi pengambilan sampel agar dapat melihat kecenderungan bakteri *comammox* pada masing-masing lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abhradeep Majumder, Ashok Kumar Gupta, Partha Sarathi Ghosal, M. V. (2020). A review on hospital wastewater treatment : A special emphasis on occurrence and removal of pharmaceutically active compounds , resistant microorganisms , and SARS-CoV-2. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, January.
- Agustiyani, D., Imamuddin, H., & Haryanto, T. (2010). Karakter Pertumbuhan dan Aktivitas Nitrifikasi Kultur Mikroba N-Sw. *Jurnal Ilmiah Nasional*, 3(2), 69–78.
- Ahmed, I., Ofori-Amanfo, D., Awuah, E., & Cobbold, F. (2019). A Comprehensive Study on the Physicochemical Characteristics of Faecal Sludge in Greater Accra Region and Analysis of Its Potential Use as Feedstock for Green Energy. *Journal of Renewable Energy*, 2019, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/8696058>
- Annavajhala, M. K., Kapoor, V., Santo-Domingo, J., & Chandran, K. (2018). Comammox Functionality Identified in Diverse Engineered Biological Wastewater Treatment Systems. *Environmental Science and Technology Letters*, 5(2), 110–116. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00577>
- Arisa, R. P. R., Kushartono, E. W., & Atmodjo, W. (2014). Sebaran sedimen dan kandungan bahan organik pada sedimen dasar Perairan Pantai Slamaran Pekalongan. *Journal of Marine Research*, 3(3), 342–350.
- Aspelin, V., & Ekholm, J. (2017). *Inhibition of Nitrification in Industrial Wastewater – Identification of Sources*. 103. <http://lup.lub.lu.se/luur/download?func=downloadFile&recordId=8919869&fileId=8919875>
- Astuti, Y. W., Widodo, L. U., & Budisantoso, I. (2013). Pengaruh Bakteri Pelarut Fosfat dan Bakteri Penambat Nitrogen terhadap Pertumbuhan Tanaman Tomat pada Tanah Masam. *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA: A Scientific Journal*, 30(3), 134–142. <https://journal.bio.unsoed.ac.id/index.php/biosfera/article/view/138>
- Barus, B. S., Munthe, R. Y., & Bernando, M. (2020). Kandungan Karbon Organik Total dan Fosfat pada Sedimen di Perairan Muara Sungai Banyuasin, Sumatra

- Selatan. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis*, 12(2), 397–408.
<https://doi.org/10.29244/jitkt.v12i2.28211>
- Beach, N. K., & Noguera, D. R. (2019). Design and assessment of species-level qPCR primers targeting comammox. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00036>
- Bennett, K. (2019). Natural vs. Artificial Environments. *Encyclopedia of Evolutionary Psychological Science*, 1–4. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16999-6_2928-1
- Bird, E. L., Ige, J. O., Pilkington, P., Pinto, A., Petrokofsky, C., & Burgess-Allen, J. (2018). Built and natural environment planning principles for promoting health: An umbrella review. *BMC Public Health*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5870-2>
- Blackburne, R., Vadivelu, V. M., Yuan, Z., & Keller, J. (2007). Kinetic characterisation of an enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter. *Water Research*, 41(14), 3033–3042. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.043>
- Camejo, P. Y., Santo Domingo, J., McMahon, K. D., & Noguera, D. R. (2017). Genome-Enabled Insights into the Ecophysiology of the Comammox Bacterium “ Candidatus Nitrospira nitrosa” . *MSystems*, 2(5), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00059-17>
- Chao, Y., Mao, Y., Yu, K., & Zhang, T. (2016). Novel nitrifiers and comammox in a full-scale hybrid biofilm and activated sludge reactor revealed by metagenomic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 8225–8237. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7655-9>
- Chu, H., Fujii, T., Morimoto, S., Lin, X., Yagi, K., Hu, J., & Zhang, J. (2007). Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2), 485–491. <https://doi.org/10.1128/AEM.01536-06>
- Daebeler, A., Güell-Bujons, Q., Mooshammer, M., Zechmeister, T., Herbold, C. W., Richter, A., Wagner, M., & Daims, H. (2023). Rapid nitrification involving comammox and canonical Nitrospira at extreme pH in saline-

- alkaline lakes. *Environmental Microbiology*, 25(5), 1055–1067.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.16337>
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., Wagner, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., ... Wagner, M. (2015). Complete nitrification by a Nitrospira bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509.
<https://doi.org/10.1038/nature16459>. Complete
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., Von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
- Daims, H., Lücker, S., & Wagner, M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(9), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
- Dang, H., & Chen, C. T. A. (2017). Ecological Energetic Perspectives on Responses of Nitrogen-Transforming Chemolithoautotrophic Microbiota to Changes in The Marine Environment. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1988–2003. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01246>
- Dewi, N. N. D. K., Dirgayusa, I. G. N. P., & Suteja, Y. (2017). Kandungan Nitrat dan Fosfat Sedimen serta Keterkaitannya dengan Kerapatan Mangrove di Kawasan Mertasari di Aliran Sungai TPA Suwung Denpasar, Bali. *Journal of Marine and Aquatic Sciences*, 3(2), 180. <https://doi.org/10.24843/jmas.2017.v3.i02.180-190>
- Dimitri Kits, K., Sedlacek, C. J., Lebedeva, E. V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., Daebeler, A., Romano, S., Albertsen, M., Stein, L. Y., Daims, H., & Wagner, M. (2017). Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 549(7671), 269–272. <https://doi.org/10.1038/nature23679>
- El-Omar, E. M. (2014). How to publish a scientific manuscript in a high-impact journal. *Advances in Digestive Medicine*, 1(4), 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.aidm.2014.07.004>

- Esti Mardiana, Eko Purwanto, B. (2014). *The Decrease Of Nitrate and Phosphate On Tofu Liquid Waste By Combined Biofilter and Eichhornia crassipes (Mart) Solms For Fish Life Media*. 3(3), 63–77.
- Fan, X. Y., Gao, J. F., Pan, K. L., Li, D. C., & Dai, H. H. (2017). Temporal dynamics of bacterial communities and predicted nitrogen metabolism genes in a full-scale wastewater treatment plant. *RSC Advances*, 7(89), 56317–56327. <https://doi.org/10.1039/c7ra10704h>
- Fawwaz, I. E., Hayati, N., & Sumaryam, S. (2024). Pengaruh Pemberian Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi serta Molase dengan C/N Rasio Berbeda terhadap Profil Kualitas Air, Kelangsungan Hidup, dan Pertumbuhan Udang Vaname *Litopenaeus vannamei*. *Juvenil: Jurnal Ilmiah Kelautan Dan Perikanan*, 5(1), 47–52. <https://doi.org/10.21107/juvenil.v5i1.22349>
- Gallego, S., Montemurro, N., Béguet, J., Rouard, N., Philippot, L., Pérez, S., & Martin-Laurent, F. (2021). Ecotoxicological risk assessment of wastewater irrigation on soil microorganisms: Fate and impact of wastewater-borne micropollutants in lettuce-soil system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223(June). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112595>
- Gao, D. W., & Tao, Y. (2011). Versatility and Application of Anaerobic Ammonium-oxidizing Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 887–894. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3411-3>
- Gao, F., Li, Y., Fan, H., Xue, J., & Yao, H. (2022). Main environmental drivers of abundance, diversity, and community structure of comammox *Nitrospira* in paddy soils. *Pedosphere*, 33(5), 808–818. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.06.061>
- Gottshall, E. Y., Bryson, S. J., Cogert, K. L., Landreau, M., Sedlacek, C. J., Stahl, D. A., Daims, H., & Winkler, M. (2021). Sustained nitrogen loss in a symbiotic association of Comammox *Nitrospira* and Anammox bacteria. *Water Research*, 202, 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117426>
- Grunditz, C., & Dalhammar, G. (2001). Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Research*, 35(2), 433–440. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00312-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00312-2)
- Guillen-Burrieza, E., Moritz, E., Hobisch, M., & Muster-Slawitsch, B. (2023).

- Recovery of ammonia from centrate water in urban waste water treatment plants via direct contact membrane distillation: Process performance in long-term pilot-scale operation. *Journal of Membrane Science*, 667(November 2022). <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2022.121161>
- Hadiarti, D. (2015). Penentuan Kadar Sulfat Air Mineral Kemasan Gelas Yang Beredar Di Pontianak Dengan Metode Sm. Ed. 21 Th. 2005. *Prosiding SEMIRTA*, 57–62.
- Haerani, R., & Ardiatma, D. (2022). Studi Pengolahan Lumpur Tinja di Balai Pialam Yogyakarta. *Prosiding Sainstek: Sains Dan Teknologi*, 1(1), 555–559.
- Hamonangan, M. C., & Yuniarto, A. (2022). Kajian Penyisihan Amonia dalam Pengolahan Air Minum Konvensional. *Jurnal Teknik ITS*, 11(2). <https://doi.org/10.12962/j23373539.v11i2.85611>
- Haslina, H., NorRuwaida, J., Dewika, M., Rashid, M., Md Ali, A. H., Khairunnisa, M. P., & Afiq Daniel Azmi, M. (2021). Landfill Leachate Treatment Methods and Its Potential for Ammonia Removal and Recovery - A Review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1051(1), 012064. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1051/1/012064>
- He, M., & Dijkstra, F. A. (2015). Phosphorus addition enhances loss of nitrogen in a phosphorus-poor soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 82(January), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.12.015>
- Hilmi, F. M., Aryanto, R. T. B., Handayani, S. D., Priutama, Y. E., Rahmalia, I., Sofiyah, E. S., Sarwono, A., & Suryawan, I. W. K. (2022). Selection of Ammonia and Tss Removal in Effluent Water From Duri Kosambi Iplt Using Analytic Hierarchy Process (Ahp). *Jurnal Arsip Rekayasa Sipil Dan Perencanaan*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.24815/jarsp.v5i1.24481>
- Hu, H. W., & He, J. Z. (2017a). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. In *Journal of Soils and Sediments* (Vol. 17, Issue 12, pp. 2709–2717). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1851-9>
- Hu, H. W., & He, J. Z. (2017b). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, 17(12), 2709–2717. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1851-9>

- Huang, Z., Gedalanga, P. B., Asvapathanagul, P., & Olson, B. H. (2010). Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Research*, 44(15), 4351–4358. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.037>
- Hutami, R., Bisyrri, H., Sukarno, S., Nuraini, H., & Ranasasmita, R. (2018). Ekstraksi DNA dari Daging Segar untuk Analisis dengan Metode Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Jurnal Agroindustri Halal*, 4(2), 209–216. <https://doi.org/10.30997/jah.v4i2.1409>
- Ifadah, A. (2011). Analisis Metode Principal Component Analysis (Komponen Utama) dan Regresi Ridge dalam Mengatasi Dampak Multikolinearitas dalam Analisis Regresi Linear Berganda. In *Skripsi*. <http://lib.unnes.ac.id/2434/1/3416.pdf>
- Ikhfini Munawaroh, Hamdani Dwi Prasetyo, H. L. (2023). Evaluasi Kadar Oksigen Terlarut, Nitrat, dan Nitrit Pada Kolam Wetland Dengan Tanaman Tasbih (*Canna indica*) Di Instalasi Pengolahan Limbah Tinja (IPLT) Supit Urang - Kota Malang. *Journal of Science and Technology*, September.
- Ilma, Q. (2021). Isolasi dan uji kemampuan bakteri dari biofilm akuakultur air tawar yang berperan dalam penurunan kadar nitrit, nitrat dan amonium. *Repository.Uinjkt.Ac.Id*. [https://repository.uinjkt.ac.id/dspace/handle/123456789/56261%0Ahttps://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/56261/1/QORIATUL ILMA-FST.pdf](https://repository.uinjkt.ac.id/dspace/handle/123456789/56261%0Ahttps://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/56261/1/QORIATUL%20ILMA-FST.pdf)
- Jan-Michael Blum, Qingxian Su, Yunjie Ma, Borja Valverde-Pierrez, Carlos Domingo-Fielez, M. M. J. B. F. S. (2018). *The pH dependency of N-converting enzymatic processes, pathways and microbes: effect on net N₂O production*.
- Jhuma, M. (2016). Environment In Context : A Perspective From Environment Behavior Relation. *International Journal of Humanities and Social Science Invention*, 5(3), 37–43.
- Jia, F., Lai, C., Chen, L., Zeng, G., Huang, D., Liu, F., Li, X., Luo, P., Wu, J., Qin, L., Zhang, C., Cheng, M., & Xu, P. (2017). Spatiotemporal and species variations in prokaryotic communities associated with sediments from surface-flow constructed wetlands for treating swine wastewater. *Chemosphere*, 185,

- 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.132>
- Johnson, D. L., Ambrose, S. H., Bassett, T. J., Bowen, M. L., Crummey, D. E., Isaacson, J. S., Johnson, D. N., Lamb, P., Saul, M., & Winter-Nelson, A. E. (1997). Meanings of Environmental Terms. *Journal of Environmental Quality*, 26(3), 581–589. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030002x>
- Keene, N. A., Reusser, S. R., Scarborough, M. J., Grooms, A. L., Seib, M., Santo Domingo, J., & Noguera, D. R. (2017). Pilot plant demonstration of stable and efficient high rate biological nutrient removal with low dissolved oxygen conditions. *Water Research*, 121, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.029>
- Kempanapura Shivashankar Shivaprasad, Sahana, M. (2023). Hospital wastewater treatment coupling electrochemical coagulation and activated sludge process. *13(9)*, 655–668. <https://doi.org/10.2166/washdev.2023.041>
- Klotz, M. G., & Stein, L. Y. (2008). Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 278(2), 146–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00970.x>
- Koch, H., van Kessel, M. A. H. J., & Lücker, S. (2019). Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox Nitrospira. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9486-3>
- Koda, E., Miskowska, A., & Siczka, A. (2017). Levels of organic pollution indicators in groundwater at the old landfill and waste management site. *Applied Sciences (Switzerland)*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/app7060638>
- Kumar, A. (2018). Brief Introduction of Environment, Ecology and Environmental Pollution. *Modern Management & Entrepreneurship (JMME)*, 08(01), 314–322.
- Kuypers, M. M. M. (2017). Microbiology: A fight for scraps of ammonia. *Nature*, 549(7671), 162–163. <http://www.nature.com/doi/10.1038/549162a>
- Lancaster, K. M., Caranto, J. D., Majer, S. H., & Smith, M. A. (2018). Alternative Bioenergy: Updates to and Challenges in Nitrification Metalloenzymology. *Joule*, 2(3), 421–441. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2018.01.018>
- Lawson, C. E., & Lücker, S. (2018). Complete ammonia oxidation: an important

- control on nitrification in engineered ecosystems? *Current Opinion in Biotechnology*, *50*, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.015>
- Liu, C., Yu, D., Wang, Y., Chen, G., Tang, P., & Huang, S. (2020). A novel control strategy for the partial nitrification and anammox process (PN/A) of immobilized particles: Using salinity as a factor. *Bioresource Technology*, *302*(January), 122864. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122864>
- Liu, G., & Wang, J. (2013). Long-term low DO enriches and shifts nitrifier community in activated sludge. *Environmental Science and Technology*, *47*(10), 5109–5117. <https://doi.org/10.1021/es304647y>
- Liu, H., Qin, S., Li, Y., Zhao, P., Nie, Z., & Liu, H. (2023a). Comammox Nitrospira and AOB communities are more sensitive than AOA community to different fertilization strategies in a fluvo-aquic soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *342*(October 2022). <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108224>
- Liu, H., Qin, S., Li, Y., Zhao, P., Nie, Z., & Liu, H. (2023b). Comammox Nitrospira and AOB communities are more sensitive than AOA community to different fertilization strategies in a fluvo-aquic soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *342*(October 2022), 108224. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108224>
- Liu, H., Tao, Z., Liu, H., Xu, W., Qin, Y., Nie, Z., & Tan, W. (2024). Soil pH and phosphorus drive the canonical nitrifiers and comammox Nitrospira communities in citrus orchards with different cultivation ages. *Soil Ecology Letters*, *6*(2). <https://doi.org/10.1007/s42832-023-0199-x>
- Liu, S., Cai, H., Wang, J., Wang, H., Zheng, T., Chen, Q., & Ni, J. (2021). In-situ expressions of comammox Nitrospira along the Yangtze River. *Water Research*, *200*, 117241. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117241>
- Liu, S., Jiang, J., Yin, M., Zheng, Y., Wang, C., & Yan, L. (2023). Promoting performance of Anammox by iron loaded sludge biochar with hydrothermal carbonization (HTC-Fe-BC) addition. *Process Safety and Environmental Protection*, *170*, 596–607. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.12.032>
- Liu, S., Wang, H., Chen, L., Wang, J., Zheng, M., Liu, S., Chen, Q., & Ni, J. (2020). Comammox Nitrospira within the Yangtze River continuum: community,

- biogeography, and ecological drivers. *ISME Journal*, 14(10), 2488–2504.
<https://doi.org/10.1038/s41396-020-0701-8>
- Liu, T., Wang, Z., Wang, S., Zhao, Y., Wright, A. L., & Jiang, X. (2019). Responses of ammonia-oxidizers and comammox to different long-term fertilization regimes in a subtropical paddy soil. *European Journal of Soil Biology*, 93.
<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2019.103087>
- Liu, Z., Wei, Q., Zou, D., Zhang, S., Zhang, C., Quan, Z., & Li, M. (2022). Deterministic Factors Determine the Comammox Community Composition in the Pearl River Estuary Ecosystem. *Microbiology Spectrum*, 10(4).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01016-22>
- Luo, H., Song, Y., Zhou, Y., Yang, L., & Zhao, Y. (2017). Effects of rapid temperature rising on nitrogen removal and microbial community variation of anoxic/aerobic process for ABS resin wastewater treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(6), 5509–5520.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-8233-5>
- Luo, S., Peng, Y., Liu, Y., & Peng, Y. (2022). Research progress and prospects of complete ammonia oxidizing bacteria in wastewater treatment. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 16(9).
<https://doi.org/10.1007/s11783-022-1555-2>
- Luo, Y., Shen, C., Tang, D., Bai, Y., Wu, L., Zhang, Y., Wu, Y., & Wang, Z. (2022). The effects of ammonia exposure on immune response, oxidative stress, and apoptosis in *Procambarus clarkii*. *Aquaculture International*, 30(2), 533–546.
<https://doi.org/10.1007/s10499-021-00828-w>
- Luque-Almagro, V. M., Huertas, M. J., Sáez, L. P., Luque-Romero, M. M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., Roldán, M. D., & Blasco, R. (2008). Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6280–6288.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00916-08>
- Maddela, N. R., Gan, Z., Meng, Y., Fan, F., & Meng, F. (2022). Occurrence and Roles of Comammox Bacteria in Water and Wastewater Treatment Systems: A Critical Review. *Engineering*, 17, 196–206.

<https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.024>

Martin, P. (2020). *Seleksi Ketahanan 4 Klon Bibit Karet terhadap Air Limbah Pabrik Karet.*

Mehrani, M. J., Lu, X., Kowal, P., Sobotka, D., & Małkinia, J. (2021). Incorporation of the complete ammonia oxidation (comammox) process for modeling nitrification in suspended growth wastewater treatment systems. *Journal of Environmental Management*, 297(March).

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113223>

Mehrani, M. J., Sobotka, D., Kowal, P., Ciesielski, S., & Małkinia, J. (2020). The occurrence and role of *Nitrospira* in nitrogen removal systems. *Bioresource Technology*, 303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122936>

Mehrani, M. J., Sobotka, D., Kowal, P., Guo, J., & Małkinia, J. (2022). New insights into modeling two-step nitrification in activated sludge systems – The effects of initial biomass concentrations, comammox and heterotrophic activities. *Science of the Total Environment*, 848(April).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157628>

Mota, M., Rodríguez, R., Solanas, E., & Fondevila, M. (2005). Evaluation of four tropical browse legumes as nitrogen sources: Comparison of in vitro gas production with other methods to determine N degradability. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124 Pa, 341–350.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.018>

Nainggolan, T. A., Khotimah, S., & Turnip, M. (2015). Bakteri Pendegradasi Amonia Limbah Cair Karet Pontianak Kalimantan Barat. *Protobiont*, 4, 69–76.

Oktafia, R. E., & Badruzsaufari. (2021). Analisis Filogenetik *Garcinia* spp. Berdasarkan Sekuens Gen rRNA (Phylogenetic Analysis of *Garcinia* spp. Based on rRNA Gene Sequences). *Ziraa'ah*, 46(2), 259–264.

Palatinszky, M., Herbold, C., Jehmlich, N., Pogoda, M., Han, P., Bergen, V., Lagkouvardos, I., Karst, S. M., Galushko, A., Berry, D., Daims, H., & Wagner, M. (2015). Cyanate as energy source for nitrifiers. *Europe PMC Funders Group*, 524(7563), 105–108. <https://doi.org/10.1038/nature14856>. Cyanate

Palomo, A., Pedersen, A. G., Fowler, S. J., Dechesne, A., Sicheritz-Pontén, T., &

- Smets, B. F. (2018). Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox Nitrospira. *ISME Journal*, 12(7), 1779–1793. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0083-3>
- Pan, K. L., Gao, J. F., Fan, X. Y., Li, D. C., & Dai, H. H. (2018). The more important role of archaea than bacteria in nitrification of wastewater treatment plants in cold season despite their numerical relationships. *Water Research*, 145, 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.066>
- Pariente, M. I., Segura, Y., Álvarez-Torrellas, S., Casas, J. A., de Pedro, Z. M., Diaz, E., García, J., López-Muñoz, M. J., Marugán, J., Mohedano, A. F., Molina, R., Munoz, M., Pablos, C., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A. L., Rodríguez, J. J., Tobajas, M., & Martínez, F. (2022). Critical review of technologies for the on-site treatment of hospital wastewater: From conventional to combined advanced processes. *Journal of Environmental Management*, 320(August). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115769>
- Petti, C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44(8), 1108–1114. <https://doi.org/10.1086/512818>
- Pjevac, P., Schauburger, C., Poghosyan, L., Herbold, C. W., van Kessel, M. A. H. J., Daebeler, A., Steinberger, M., Jetten, M. S. M., Lücker, S., Wagner, M., & Daims, H. (2017). AmoA-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox Nitrospira in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01508>
- Putri, N. C. (2015). Study of Faecal Sludge Treatment Plant Implementation in Indonesia. *Skripsi Institut Teknologi Surabaya*, 5–76. https://repository.its.ac.id/62941/4/3311100044-Undergraduate_Theses.pdf
- Putri, R. N. (2019). Pengaruh Air Lindi terhadap Air Tanah di Sekitar Tempat Pembuangan Akhir Sampah Air Dingin Kota Padang. *Jurnal Azimut*, 2(1), 72. <https://doi.org/10.31317/jaz.v2i1.438>
- Rahmadani, A. F., Faisal, F., Ramadhan, M., & Prasetyo, H. D. (2023). Isolasi dan Identifikasi Awal Bakteri Patogen pada Kolam Maturasi IPLT Supit Urang Kota Malang. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Sains Unisma Malang*, 1(2), 41.

<https://doi.org/10.33474/jimsum.v1i2.22559>

- Ramadhanti, S. A. (2016). *Analisis Kandungan Zat Pencemar dalam Air Lindi serta Potensi Penyebarannya di TPA Gunung Tugel Banyumas. Ii*, 1–11.
- Rawis, L., Mangangka, I. R., & Legrans, R. R. . (2022). Analisis Kinerja Instalansi Pengolahan Air Limbah (IPAL) di Rumah Sakit Bhayangkara Tingkat III Manado. *Tekno*, 20, 233–243.
<https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/tekno/article/view/42567>
- Rianto, D. R., Haeruddin, & Febrianto, S. (2021). Distribusi Spasial Amonia, Nitrit dan Escherichia coli dari Limbah Instalasi Pengolahan Lumpur Tinja (IPLT) Tanggung Rejo, Kota Semarang. *Maquares*, 7(2), 181–188.
- Rizqina Ersa, G., Soedjono, E. S., Slamet, A., & Nurhayati, E. (2023). *Potensi Fosfat dari Tangki Septik di Kota Surabaya, Indonesia*. 16(April), 17–26.
- Rokhim, N. (2022). Analysis of Bacterial Content in Garbage at TPA Segawe, Tulungagung Regency. *Asian Journal of Natural Sciences*, 1(1), 1–8.
- Roots, P., Wang, Y., Rosenthal, A. F., Griffin, J. S., Sabba, F., Petrovich, M., Yang, F., Kozak, J. A., Zhang, H., & Wells, G. F. (2019a). Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Research*, 157(2), 396–405.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.060>
- Roots, P., Wang, Y., Rosenthal, A. F., Griffin, J. S., Sabba, F., Petrovich, M., Yang, F., Kozak, J. A., Zhang, H., & Wells, G. F. (2019b). Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Research*, 157(847), 396–405.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.060>
- Ruscalleda Beylier, M., Balaguer, M. D., Colprim, J., Pellicer-Nàcher, C., Ni, B. J., Smets, B. F., Sun, S. P., & Wang, R. C. (2019). Biological nitrogen removal from domestic wastewater. *Comprehensive Biotechnology*, 6, 285–296.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00360-8>
- Sakoula, D., Koch, H., Frank, J., Jetten, M. S. M., van Kessel, M. A. H. J., & Lücker, S. (2021). Enrichment and physiological characterization of a novel comammox Nitrospira indicates ammonium inhibition of complete nitrification. *ISME Journal*, 15(4), 1010–1024.

<https://doi.org/10.1038/s41396-020-00827-4>

- Santos, J. P., Mendes, D., Monteiro, M., Ribeiro, H., Baptista, M. S., Borges, M. T., & Magalhães, C. (2018). Salinity impact on ammonia oxidizers activity and amoA expression in estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 211, 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.09.001>
- Sciences, M., Amouei, A., Asgharnia, H., Fallah, H., & Faraji, H. (2015). *Characteristics of Effluent Wastewater in Hospitals of Babol University of*. 4(2), 4–7.
- Sepriani, Abidjulu, J., & Kolengan, H. S. (2016). Pengaruh Limbah Cair Industri Tahu Terhadap Kualitas Air Sungai Paal 4 Kecamatan Tikala Kota Manado. *Chemistry Progress*, 9(1), 29–33.
- Setiawan, A., & Hari, B. (2010). Karakteristik Proses Klarifikasi dalam Sistem Nitrifikasi-Denitrifikasi Untuk Pengolahan Limbah Cair dengan Kandungan N-NH₃ Tinggi. In *Universitas Diponegoro* (Vol. 1).
- Shi, X., Hu, H. W., Wang, J., He, J. Z., Zheng, C., Wan, X., & Huang, Z. (2018). Niche separation of comammox Nitrospira and canonical ammonia oxidizers in an acidic subtropical forest soil under long-term nitrogen deposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 126(September), 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.004>
- Shi, Y., Jiang, Y., Wang, S., Wang, X., & Zhu, G. (2020a). Biogeographic distribution of comammox bacteria in diverse terrestrial habitats. *Science of the Total Environment*, 717, 137257. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137257>
- Shi, Y., Jiang, Y., Wang, S., Wang, X., & Zhu, G. (2020b). Biogeographic distribution of comammox bacteria in diverse terrestrial habitats. *Science of the Total Environment*, 717. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137257>
- Singh, B. D., & Singh, A. K. (2015). Marker-assisted plant breeding: Principles and practices. *Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices*, 1–514. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2316-0>
- Sobotka, Kowal, ZubrowskaSudoł, and M. (2018). Comammox - a new pathway in the nitrogen cycle in wastewater treatment plants. *Journal of Civil Engineering and Environmental Sciences*, 4, 031–033.

<https://doi.org/10.17352/2455-488x.000024>

- Spasov, E., Tsuji, J. M., Hug, L. A., Doxey, A. C., Sauder, L. A., Parker, W. J., & Neufeld, J. D. (2020). High functional diversity among *Nitrospira* populations that dominate rotating biological contactor microbial communities in a municipal wastewater treatment plant. *ISME Journal*, *14*(7), 1857–1872. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0650-2>
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, *26*(3). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>
- Sun, D., Tang, X., Zhao, M., Zhang, Z., Hou, L., Liu, M., Wang, B., Klümper, U., & Han, P. (2020a). Distribution and Diversity of Comammox *Nitrospira* in Coastal Wetlands of China. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589268>
- Sun, D., Tang, X., Zhao, M., Zhang, Z., Hou, L., Liu, M., Wang, B., Klümper, U., & Han, P. (2020b). Distribution and Diversity of Comammox *Nitrospira* in Coastal Wetlands of China. *Frontiers in Microbiology*, *11*(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589268>
- Sun, P., Zhang, S., Wu, Q., Zhu, P., Ruan, Y., & Wang, Q. (2021). pH and ammonium concentration are dominant predictors of the abundance and community composition of comammox bacteria in long-term fertilized Mollisol. *Applied Soil Ecology*, *168*(March). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104139>
- Sun, R., Myrold, D. D., Wang, D., Guo, X., & Chu, H. (2019). AOA and AOB communities respond differently to changes of soil pH under long-term fertilization. *Soil Ecology Letters*, *1*(3–4), 126–135. <https://doi.org/10.1007/s42832-019-0016-8>
- Sun, S., Song, Y., Yang, X. J., Hu, H., Wu, S., Qi, W. kang, & Li, Y. Y. (2018). Strategies for improving nitrogen removal under high sludge loading rate in an anammox membrane bioreactor operated at 25 °C. *Chemical Engineering Science*, *183*, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.03.011>
- Takahashi, Y., Fujitani, H., Hirono, Y., Tago, K., Wang, Y., Hayatsu, M., & Tsuneda, S. (2020). Enrichment of Comammox and Nitrite-Oxidizing *Nitrospira* From Acidic Soils. *Frontiers in Microbiology*, *11*(July), 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01737>

- Tang, X., Li, Y., Liu, M., Hou, L., & Han, P. (2023). Abundance, diversity and physiological preferences of comammox Nitrospira in urban groundwater. *Science of the Total Environment*, 904(September). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167333>
- Tang, Y., Zhang, X., Li, D., Wang, H., Chen, F., Fu, X., Fang, X., Sun, X., & Yu, G. (2016). Impacts of nitrogen and phosphorus additions on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and denitrifying bacteria in Chinese fir plantations. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.09.001>
- Van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op Den Camp, H. J. M., Kartal, B., Jetten, M. S. M., & Lüscher, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- Vitaliy B. Borisov, Robert B. Gennis, James Hemp, and M. I. V. (2011). The cytochrome bd respiratory oxygen reductases Vitaliy. *NIH Public Access*, 49(4), 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.06.016>
- Wang, H., Zhi, W., Deng, N., & Ji, G. (2017). Review on the fate and mechanism of nitrogen pollutant removal from wastewater using a biological filter. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(5), 1943–1954. <https://doi.org/10.15244/pjoes/69170>
- Wang, J., Wang, J., Rhodes, G., He, J. Z., & Ge, Y. (2019). Adaptive responses of comammox Nitrospira and canonical ammonia oxidizers to long-term fertilizations: Implications for the relative contributions of different ammonia oxidizers to soil nitrogen cycling. *Science of the Total Environment*, 668, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.427>
- Wang, M., Huang, G., Zhao, Z., Dang, C., Liu, W., & Zheng, M. (2018). Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox amoA gene in full-scale wastewater treatment plants. *Bioresour Technol*, 270(September), 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.089>
- Wang, Q., Zhao, Z., Yuan, M., Zhang, Z., Chen, S., Ruan, Y., & Huang, Q. (2022). Impacts of urea and 3,4-dimethylpyrazole phosphate on nitrification, targeted

- ammonia oxidizers, non-targeted nitrite oxidizers, and bacteria in two contrasting soils. *Frontiers in Microbiology*, 13(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.952967>
- Wang, Y., Huang, D.-Q., Yang, J.-H., Li, G.-F., Zhou, Y.-X., Zhang, J.-Y., Lu, Y., Fan, N., & Jin, R. C. (2023). Polyamide microplastics act as carriers for cephalixin in the anammox process, *Chemical Engineering Journal*. *Chemical Engineering Journal*, 451(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138685>.
- Wang, Y., Zhang, S., Jin, H., Chen, J., Zhou, K., Chen, J., Chen, J., & Zhu, G. (2023). Effects of dam building on the occurrence and activity of comammox bacteria in river sediments and their contribution to nitrification. *Science of the Total Environment*, 864(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161167>
- Wu, H., Fan, J., Zhang, J., Ngo, H. H., Guo, W., Hu, Z., & Lv, J. (2016). Optimization of Organics and Nitrogen Removal in Intermittently Aerated Vertical Flow Constructed Wetlands: Effects of Aeration Time and Aeration Rate. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 113, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.031>
- Xie, C., Yu, K., Yin, Y., Wang, L., Qiu, Z., & Qin, H. (2023). Abundance, diversity and changes to environmental variables of comammox *Nitrospira* in bioretention system. *Journal of Water Process Engineering*, 51(August 2022). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103411>
- Xu, Y., Liu, G., Hua, Y., Wan, X., Hu, J., Zhu, D., & Zhao, J. (2020). The diversity of comammox bacteria and the effect of sewage discharge on their abundance in eutrophic lake sediments. *Journal of Soils and Sediments*, 20(5), 2495–2503. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02618-y>
- Yang, K., Luo, S., Hu, L., Chen, B., Xie, Z., Ma, B., Ma, W., Du, G., Ma, X., & Le Roux, X. (2020). Responses of soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea diversity to N, P and NP fertilization: Relationships with soil environmental variables and plant community diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 145(May 2019), 107795. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107795>
- Yang, X., Wu, Y., Shu, L., Gu, H., Liu, F., Ding, J., Zeng, J., Wang, C., He, Z., Xu,

- M., Liu, F., Zheng, X., & Wu, B. (2024). Unraveling the important role of comammox Nitrospira to nitrification in the coastal aquaculture system. *Frontiers in Microbiology*, 15(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1355859>
- Yao, Q., & Peng, D. C. (2017). Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0328-y>
- Ye, J., Zhao, S., Ren, J., Zhang, X., Xie, W., Meng, H., He, H., & Zhang, L. (2024). Higher contribution by comammox bacteria than AOA and AOB to nitrification in the sediments of lake Taihu. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 187(November 2023). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2023.105709>
- Yin, H., Gao, Y., & Fan, C. (2011). Distribution, sources and ecological risk assessment of heavy metals in surface sediments from Lake Taihu, China. *Environmental Research Letters*, 6(4). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/6/4/044012>
- Yuan, D., Zheng, L., Tan, Q., Wang, X., Xing, Y., Wang, H., Wang, S., & Zhu, G. (2021). Comammox activity dominates nitrification process in the sediments of plateau wetland. *Water Research*, 206(October). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117774>
- Zekker, I., Rikmann, E., Kroon, K., Mandel, A., Mihkelson, J., Tenno, T., & Tenno, T. (2017). Ameliorating nitrite inhibition in a low-temperature nitrification–anammox MBBR using bacterial intermediate nitric oxide. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(11), 2343–2356. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1321-3>
- Zhang, H., Cheng, F., Sun, S., & Li, Z. (2022). Diversity distribution and characteristics of comammox in different ecosystems. *Environmental Research*, 214(P2), 113900. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113900>
- Zhang, K., Zheng, X., He, Z., Yang, T., Shu, L., Xiao, F., Wu, Y., Wang, B., Li, Z., Chen, P., & Yan, Q. (2020). Fish growth enhances microbial sulfur cycling in aquaculture pond sediments. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1597–1610.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13622>

- Zhang, M., Huang, J. C., Sun, S., Rehman, M. M. U., He, S., & Zhou, W. (2021). Nitrogen removal through collaborative microbial pathways in tidal flow constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 758(xxxx), 143594. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143594>
- Zhang, Y., Ma, H., Chen, R., Niu, Q., & Li, Y. Y. (2018). Stoichiometric variation and loading capacity of a high-loading anammox attached film expanded bed (AAEEB) reactor. *Bioresource Technology*, 253, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.043>
- Zhao, Z., Huang, G., He, S., Zhou, N., Wang, M., Dang, C., Wang, J., & Zheng, M. (2019a). Abundance and community composition of comammox bacteria in different ecosystems by a universal primer set. *Science of the Total Environment*, 691, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.131>
- Zhao, Z., Huang, G., He, S., Zhou, N., Wang, M., Dang, C., Wang, J., & Zheng, M. (2019b). Abundance and community composition of comammox bacteria in different ecosystems by a universal primer set. *Science of the Total Environment*, 691(December), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.131>
- Zheng, M., Tian, Z., Chai, Z., Zhang, A., Gu, A., Mu, G., Wu, D., & Guo, J. (2023). Ubiquitous occurrence and functional dominance of comammox Nitrospira in full-scale wastewater treatment plants. *Water Research*, 236(March). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119931>
- Zheng, M., Wang, M., Zhao, Z., Zhou, N., He, S., Liu, S., Wang, J., & Wang, X. (2019). Transcriptional activity and diversity of comammox bacteria as a previously overlooked ammonia oxidizing prokaryote in full-scale wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 656, 717–722. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.435>

Lampiran 1 Analisis Mikrobiologi

1. Persiapan Percobaan

Berikut merupakan peralatan yang digunakan dalam penelitian ini:

1.1 Ekstraksi DNA

- 1) *FastDNA SPIN Kit for Soil*
- 2) Alkohol

1.2 PCR DNA dan persiapan konsentrasi primer

- 1) *Pipettor* (100 μ L, 20 μ L, 10 μ L, 2,5 μ L)
- 2) *Chip with filter*
- 3) Wadah untuk membuang *chip*
- 4) Tabung 1,5 mL (Untuk menghomogenkan *PCR reactor solution*)
- 5) Tabung PCR (Untuk mengencerkan DNA)
- 6) 5 tabung dan tutup
- 7) Rak tabung 1,5 mL
- 8) *Cooling box*
- 9) *Cooling rack* untuk tabung PCR
- 10) *Ultra pure water*
- 11) 5 *Primer star GXL Buffer*
- 12) *dNTP Mixture*
- 13) *Forward primer* (515 F) disesuaikan 10 pmol/ μ L
- 14) *Reserve primer* (806 F) disesuaikan 10 pmol/ μ L
- 15) *Primer STAR GXL polymerase*
- 16) *DNA template* (sampel DNA)
- 17) *Positive control DNA template*
- 18) *Negative control DNA template*

1.3 Agarose gel electrophoresis

- 1) *Agarose gel*
- 2) *Alat Electrophoresis*
- 3) *Micro pipettor* (200 μ L, 10 μ L)
- 4) *Chip with filter* (200 μ L, 10 μ L)
- 5) *No filter chip* (200 μ L, 10 μ L)

- 6) *Parafilm* (untuk menghomogenkan sampel PCR dengan pewarna)
- 7) Pulpen (*convenient for fixing parafilm*)
- 8) PCR product of 3.1
- 9) *Dyeing agent* (*midori green direct or Syber green direct*)
- 10) *DNA ladder Marker* 100bp
- 11) 1 × TAE

1.4 DNA Purification after first and second PCR

- 1) *Micro Pipette* (200 μ L, 10 μ L)
- 2) *Micro Pipette tips* (*with and without filters*)
- 3) *Ultrapure water*
- 4) *Ampure PX liquid*
- 5) 70 % Ethanol
- 6) Sampel (hasil PCR Pertama)

2. Ekstraksi DNA

- 1) Persiapan sampel. Sampel dipindahkan dari botol ke tabung 50 mL;
- 2) Sampel ditambahkan PBS hingga 40 mL dan homogenkan dengan mesin *centrifuge* pada $8.000 \times g$ selama 5 menit;
- 3) Ambil tabung *Lysing Matrix E* yang dibutuhkan dari *DNA Extraktion kit* dan tambahkan sampel;
- 4) Beri tanda berurutan;
- 5) Tambahkan 950 μ L *Sodium Phosphate Buffer* ke sampel dalam tabung *Lysing Matrix E*;
- 6) Tambahkan 122 μ L MT Buffer;
- 7) Homogenkan di *FastPrep instrument*;

Atur alat dengan kecepatan 4500 rpm dalam waktu 20 detik dan lakukan dua kali dengan kondisi yang sama;

Hidupkan mesin → tekan tombol *power* → ubah kondisi menjadi 4500 rpm dan 20 detik → tekan tombol *start* → setelah selesai, tekan tombol *open* → keluarkan sampel → tutup mesin.

Hal yang terjadi : Gangguan Gerakan pada dinding sel menyebabkan lepasnya *nucleic acids* ke *protective buffer*.

- 8) Masukkan ke mesin *centrifuge* pada $14.000 \times g$ selama 6 menit;
Hal yang terjadi : pellet insoluble cellular material and lysing matrix particles.
Hidupkan mesin → tekan tombol *open* → buka penutup → masukkan sampel (pastikan seimbang) tutup penutup → tutup mesin → ubah kondisi menjadi 4500 rpm dan 20 detik → tekan tombol *start* → setelah selesai, tekan tombol *open* → keluarkan sampel → tutup mesin.
- 9) Pindahkan endapan ke tabung *microcentrifuge* 2 mL;
- 10) Tambahkan 250 μL PPS (*Protein Precipitation Solution*) dan homogenkan dengan membalikkan tabung sebanyak 10 kali;
Hal yang terjadi : pemisahan *nucleic acid* yang terlarut dari *lysing matrix*.
- 11) Masukkan ke mesin *centrifuge* pada $14.000 \times g$ selama 5 menit untuk memisahkan endapan dan *supernatant*. Pindahkan *supernatant* ke tabung *microcentrifuge* 15 mL;
- 12) Suspensikan Kembali dengan *Binding Matrix* sebanyak 1,0 mL ke *supernatant* di tabung 15 mL;
- 13) Balikkan dengan tangan kurang lebih selama 2 menit;
- 14) Diamkan selama 3 menit agar *nucleic acid* terikat *silica matrix*;
- 15) Sisihkan 800 μL *supernatant* dan hindari *Binding Matrix*.
- 16) Suspensikan Kembali *Binding Matrix* dengan *supernatant* yang tersisa;
- 17) Pindahkan hingga 600 μL *mixture* ke SPINTM filter;
- 18) Masukkan ke mesin *centrifuge* pada $14,000 \times g$ selama 1 menit;
- 19) Kosongkan tabung dibawah filter;
- 20) Tambahkan sisa *mixture* pada tabung 15 ml ke SPIN filter dan masukkan ke mesin *centrifuge* pada $14,000 \times g$ selama 1 menit;
- 21) Kosongkan tabung di bawah filter;
- 22) Tambahkan 450 μL SEWS-M dan suspensikan dengan pipet agar lebih banyak protein yang terlarut;
- 23) Masukkan ke mesin *centrifuge* pada $14,000 \times g$ selama 1 menit. Kosongkan tabung penangkap dan ganti;
- 24) Tanpa tambahan larutan, Masukkan ke mesin *centrifuge* pada $14,000 \times g$ selama 2 menit “mengeringkan” *residu matrix* dari *wash solution*;
- 25) Lepaskan dan ganti tabung penangkap dengan yang baru;

- 26) Biarkan tabung selama 5 menit pada suhu ruangan agar menyisahkan residu dari ethanol;
- 27) Suspensikan Kembali *Binding Matrix* (di atas *SPIN Filter*) dengan 50 μ L of DES (*DNase/Pyrogen – Free Water*);
- 28) Siapkan *water bath* dan inkubasi pada suhu 55⁰ C selama 3 menit;
- 29) Tambahkan 50 μ L of DES dan inkubasi sampel 3 menit agar dapat mempurifikasi *nucleic acids* dari *silica*;
- 30) Masukkan ke mesin *centrifuge* pada 14,000 \times g selama 1 menit untuk mengeluarkan DNA ke tabung yang bersih;
- 31) Keluarkan *SPIN Filter*;
- 32) Hitung konsentrasi dengan *Biophotometer*,
Hidupkan mesin \rightarrow masukkan kuvet ke alat \rightarrow keluar hasil berupa konsentrasi dan rasio absorban DNA pada sampel.
- 33) DNA siap digunakan untuk PCR dan kegiatan lanjutan lainnya;
- 34) Simpan pada suhu -20⁰ C.

3. PCR Pertama

- 1) Hidupkan ruang sinar UV selama 30 menit sebelum digunakan;
- 2) Letakkan alat – alat yang akan digunakan yaitu : *pipettor, chip with filter, container for throws the chip*, tabung 1,5 ml (untuk mencampurkan PCR *Reaction solution*), rak tabung 1,5 ml. dari freezer : *cooling box, cooling rack* untuk tabung PCR, *ultra pure water* (untuk kelarutan), 10 \times PCR *buffer*, dNTP mic 2,5 ml, 515 F (10 μ m), 806 R (10 μ m), *hot star tag plus polymerase*;

Tabel 1. Larutan PCR Pertama

No	Komponen	Each sample	X + NTC + α (0.2)	Doublicate (2 sampel + NTC)	Final Concentration
1	Distilled water	18.13	108.78	217.56	
2	10 \times PCR Buffer	2.5	15	30.00	1 \times
3	2.5 mM dNTP mix	2	12	24.00	0.2 nM
4	515F (10 μ m)	0.5	3	6.00	0.2 μ m
5	806R (10 μ m)	0.5	3	6.00	0.2 μ m

- 8) Letakkan gel di atas papan plastic dan letakkan di *LED transilluminator*. Apabila berhasil maka akan terlihat *band* pada gel yang menandakan PCR berhasil atau tidak.

5. Purifikasi PCR Pertama

- 1) Tambahkan 45 mL AMPurePX ke dalam sampel;
- 2) Homogenkan dengan pipet dan diamkan selama 5 menit;
- 3) Pindahkan ke *magnetic plate* dan diamkan selama 2 menit;
- 4) Homogenkan sampel dengan pipet tanpa mengganggu flok;
- 5) Diamkan selama 2 menit dan sisihkan semua AMPurePX pada sampel;
- 6) Basuh sampel dengan alcohol 70% sebanyak 2 kali sebanyak 180 mL;
- 7) Biarkan selama 30 detik lalu diamkan selama 5 menit;
- 8) Ambil sampel dan tambahkan *ultrapure water* sebanyak 45 mL;
- 9) Diamkan sampel selama 2 menit di *magnetic plate* untuk penyisihan senyawa lain;
- 10) Ambil semua cairan (sampel DNA) lalu simpan dalam kulkas 4⁰ C.

6. PCR Kedua

- 1) Hidupkan ruangan sinar UV selama 30 menit sebelum digunakan;
- 2) Letakkan alat – alat yang akan digunakan yaitu : *pipettor*, *chip with filter*, *container for throw the chip*, tabung 1,5 ml (untuk mencampurkan PCR *Reaction Solution*), rak tabung 1,5 ml. Dari freezer : *cooling box*, *cooling rack* untuk tabung PCR, *ultra pure water* (untuk melarutkan), 10× PCR *buffer*, dNTP mic 2,5 ml, 515 F (10 µm), 806 R (10 µm), *hot star tag plus polymerase*;

Tabel 2. Larutan PCR Kedua

No	Component	Each Sample (µl)	5 + NTC + α(0.2)	Final Concentration
1	Distilled water	14,4	89,28	
2	2 x KAPAHiFu Hotstar ReadyMix	20	124	1×
3	Forward Primer (10 µl)	1,2	7,44	0,2 mM
4	Reserve Primer (10 µl)	1,2	7,44	0,2 uM

No	Component	Each Sample (μ l)	5 + NTC + α (0.2)	Final Concentration
5	Template DNA	3,2	19,84	0,2 μ M
		40		

- 3) Sampel diencerkan berdasarkan konsentrasi yang didapat dari *Biophotometer*;
- 4) Pindah ke ruangan sinar UV dan siapkan larutan yang akan dicampurkan;
- 5) Setelah larutan pencampuran selesai, pindahkan 20 ml masing – masing;
- 6) Siapkan satu tabung untuk *negative control* dengan *ultra pure water*;
- 7) Homogenkan sampel dan larutan yang telah dicampurkan;
- 8) Hidupkan mesin PCR *Therm Cycler*;

	98 ⁰ C			
95 ⁰ C	20 s			
5 min			72 ⁰ C	72 ⁰ C
			1 min	10 min
	60 ⁰ C			
	15 s			
				10 ⁰ C
				Inf

11 cycles

Gambar : Suhu PCR Kedua

- 9) Setelah selesai ambil sampel dan simpan dalam kulkas pada suhu 4⁰.

7. Purifikasi PCR Kedua

- 1) Tambahkan 45 mL AMPurePX ke dalam sampel;
- 2) Homogenkan dengan pipet dan diamkan selama 5 menit;
- 3) Pindahkan ke *magnetic plate* dan diamkan selama 2 menit;
- 4) Homogenkan sampel dengan pipet tanpa mengganggu flok;
- 5) Diamkan selama 2 menit dan sisihkan semua AMPurePX pada sampel;
- 6) Basuh sampel dengan alkohol 70% sebanyak 2 kali sebanyak 180 mL;
- 7) Biarkan selama 30 detik lalu diamkan selama 5 menit;
- 8) Ambil sampel dan tambahkan *ultrapure water* sebanyak 45 mL;

- 9) Diamkan sampel selama 2 menit di *magnetic plate* untuk menyisahkan senyawa lain;
- 10) Ambil semua cairan (sampel DNA) lalu simpan dalam kulkas 4° C.

8. Bioanalisis

- 1) Biarkan gel dye mix di luar selama 30 menit sebelum digunakan;
- 2) Masukkan 350 µl ke *cleaner chip* perlahan;
- 3) Letakkan *Cleaner chip* dan tutup alat;
- 4) Diamkan selama 30 detik dan ulangi proses;
- 5) Tunggu 10 detik agar tutup kering;
- 6) Ambil *chip* baru;
- 7) Ambil 9 µl *dye mix gel* dan tambahkan ke G
- 8) Sesuaikan jarum suntik ke posisi terendah untuk DNA 1000 sebanyak 1 mL;
- 9) Masukkan chip dengan pewarna ke dasar dan tutup;
- 10) Tekan jarum suntik ke bawah dengan kecepatan yang sama lalu diamkan selama 1 menit;
- 11) Ambil chip dan tambahkan 9 µl pada masing-masing lubang G;
- 12) Ambil penanda DNA 5 µl dan tambahkan ke semua lubang kecuali Gs;
- 13) Ambil *DNA Ladder* 1 µl ke *ladder well*;
- 14) Ambil sampel 1 µl dan tambahkan ke *sample wells*;
- 15) Putar chip pada kecepatan 2.400 rpm selama 1 menit;
- 16) Hidupkan laptop dan masukkan chip ke dalam mesin lalu hidupkan *analyzer*;
- 17) Setelah analisis bersihkan elektroda sebanyak dua kali
- 18) Hasil akan keluar lalu cetak hasil tersebut.

9. Next Generation Sequencing

- 1) Siapkan botol 5 mL;
- 2) Tambahkan 1 mL *Rnase Free Ultrapure Water*;
- 3) Tambahkan 40 µl 0,5 M Tris-cl;
- 4) Tambahkan 20 µl *Tween20* 10%
- 5) Tambahkan 94 µl *Rnase Free Ultrapure Water*;
- 6) Homogenkan campuran larutan;

- 7) Siapkan *Phix library*, *Sample DNA library*, *Phix + DNA Library*;
- 8) Hasil akan keluar dan datanya dapat diolah.



Lampiran 2 Analisis Parameter Lingkungan

1. pH (Balai Penelitian Tanah Departemen Pertanian)

Alat-alat:

- Botol kocok 100 ml
- Dispenser 50 ml/gelas ukur
- Mesin pengocok
- Labu semprot 500 ml
- pH meter

Pereaksi:

- Larutan buffer pH 7,0 dan pH 4,0
- KCl 1 M
- Larutkan 74,5 g KCl p.a. dengan air bebas ion hingga 1 L

Cara kerja:

- 1) Timbang 10,00 g contoh tanah sebanyak dua kali, masing-masing dimasukkan ke dalam botol kocok.
- 2) Ditambah 50 ml air bebas ion ke botol yang satu (pH H₂O) dan 50 ml KCl 1 M ke dalam botol lainnya (pH KCl).
- 3) Kocok dengan mesin pengocok selama 30 menit.
- 4) Suspensi tanah diukur dengan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan larutan sangga pH 7,0 dan pH 4,0.
- 5) Laporkan nilai pH dalam satu desimal.

2. TOC (Balai Penelitian Tanah Departemen Pertanian)

Alat-alat :

- Neraca analitik
- Spektrofotometer
- Labu ukur 100 ml
- Dispenser 10 ml

Pereaksi :

- Asam sulfat pekat
- Kalium dikromat 1 N

Dilarutkan 98,1 g kalium dikromat dengan 600 ml air bebas ion dalam piala gelas, ditambahkan 100 ml asam sulfat pekat, dipanaskan hingga larut sempurna, setelah dingin diencerkan dalam labu ukur 1 l dengan air bebas ion sampai tanda garis.

- Larutan standar 5.000 ppm C

Dilarutkan 12,510 g glukosa p.a. dengan air suling di dalam labu ukur 1 l dan diimpitkan.

Cara Kerja:

- 1) Ditimbang 0,500 g contoh tanah ukuran < 0,5 mm, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
- 2) Ditambahkan 5 ml $K_2Cr_2O_7$ 1 N, lalu dikocok.
- 3) Ditambahkan 7,5 ml H_2SO_4 pekat, dikocok lalu diamkan selama 30 menit.
- 4) Diencerkan dengan air bebas ion, biarkan dingin dan diimpitkan.
- 5) Keesokan harinya diukur absorbansi larutan jernih dengan spektrofotometer pada Panjang gelombang 561 nm.
- 6) Sebagai pembanding dibuat standar 0 dan 250 ppm, dengan memipet 0 dan 5 ml larutan standar 5.000 ppm ke dalam labu ukur 100 ml dengan perlakuan yang sama dengan pengerjaan contoh.

Perhitungan :

Kadar C-organik (%)

$$= \text{ppm kurva} \times \text{ml ekstrak} / 1.000 \text{ ml} \times 100 / \text{mg contoh} \times \text{fk}$$

$$= \text{ppm kurva} \times 100 / 1.000 \times 100 / 500 \times \text{fk}$$

$$= \text{ppm kurva} \times 10 / 500 \times \text{fk}$$

Keterangan:

ppm kurva = kadar contoh yang didapat dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi blanko.

100 = konversi ke %

Fk = faktor koreksi kadar air = $100 / (100 - \% \text{ kadar air})$

3. Amonium (SNI 06-2479-1991)

Alat-alat:

- Timbangan

- Gelas Piala
- Kertas Saring
- Gelas Ukur
- Labu Penyulingan
- Erlenmeyer
- Plastik Wrab
- Pipet ukur
- spektrofotometer UV-Vis

Pereaksi :

- Aquadest
- NaCl 1 N
- MgO
- Parafin Cair
- HCl 0,02 N

Cara kerja :

Pembuatan ekstrak sedimen untuk pengujian amonium dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Ditimbang 25 g sampel sedimen kering dan dimasukkan ke dalam gelas beaker glass 100 mL;
- 2) Ditambahkan 100 mL NaCl 1 N;
- 3) Dikocok dengan kecepatan 120 rpm selama 30 menit, dan biarkan selama 30 menit;
- 4) Larutan disaring dengan kertas saring, hasil saringan ditampung dalam gelas ukur 500 mL;
- 5) Dicuci larutan uji yang terdapat di dalam gelas piala dengan larutan NaCl 1 N sampai hasil saringan menunjukkan volume 500 mL;
- 6) Hasil saringan dipindahkan ke labu penyulingan, ditambahkan 3 g MgO dan sedikit parafin cair;
- 7) Dilakukan penyulingan, hasil sulingan ditampung pada labu erlenmeyer 250 mL yang telah berisi 10 mL HCl 0,02 N;
- 8) Penyulingan dihentikan apabila hasil sulingan telah menunjukkan volume 150 mL, hasil sulingan merupakan ekstrak sedimen.

Ekstrak sedimen yang telah dibuat selanjutnya digunakan untuk pengukuran kandungan amonium dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Disiapkan erlenmeyer 50 mL untuk blanko yang kemudian diisi 25 mL aquades, lalu diberi plastik wrap; Disiapkan erlenmeyer 50 mL untuk sampel yang kemudian diisi 25 mL dari hasil ekstraksi, lalu diberi plastik wrap;
- 2) Dipipet 1 mL reagen garam dan Nessler ke dalam masing-masing erlenmeyer blanko dan sampel, diberi plastik wrap;
- 3) Larutan blanko dan sampel dimasukkan ke dalam kuvet spektro dan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 420 nm.

4. Nitrit (SNI 06-6989.9-2004)

Alat-alat :

- Spektrofotometer sinar tampak dengan kuvet silica;
- Labu ukur 50 ml; 250 ml; 500 ml dan 1000 ml;
- Pipet volumetrik 1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml dan 50 ml;
- Pipet ukur 5 ml;
- Gelas piala 200 ml dan 400 ml;
- Erlenmeyer 250 ml;
- Neraca analitik.

Pereaksi :

- Air suling bebas nitrit.

Buat air suling bebas nitrit dengan salah satu cara di bawah ini:

- 1) Dengan cara ozonisasi terhadap air demineralisasi.
- 2) Ke dalam 1000 mL air suling tambahkan sedikit kristal KMnO_4 (± 5 mg) dan Ba(OH)_2 atau Ca(OH)_2 (± 5 g). Destilasi dengan menggunakan gelas borosilikat. Buang 50 mL destilat pertama lalu tampung destilat. Destilat harus bebas permanganat (tes dengan menambahkan larutan DPD (N,N-Dietil-p-Phenilendiamin), warna merah menunjukkan adanya permanganat).

3) Ke dalam 1000 mL air suling tambahkan 1 mL H₂SO₄ p dan 0,2 mL larutan MnSO₄ (36,4 g MnSO₄.H₂O / 100 mL air suling). Tambahkan 1-3 mL larutan KMnO₄ (400 mg KMnO₄ / 1000 mL air suling) Destilasi seperti no. 3.2 a) 2) di atas.

- Glass wool.
- Kertas saring bebas nitrit berukuran pori 0,45 μm
- Larutan sulfanilamida, H₂NC₆H₄SO₂NH₂. Larutkan 5 gram sulfanilamida dalam campuran 300 mL air suling dan 50 mL HCl pekat. Encerkan dengan air suling sampai 500 mL.
- Larutan NED Dihidroklorida. Larutkan 500 mg N-(1-naphthyl)- ethylene diamine dihydrochloride (NED Dihidroklorida) dalam 500 mL air suling. Simpan dalam botol gelap dalam refrigerator. Ganti setiap bulan atau bila berwarna coklat.
- Larutan natrium oksalat, Na₂C₂O₄ 0,05 N. Larutkan 3,350 g Na₂C₂O₄ dalam air suling bebas nitrit dan tepatkan sampai 1000 mL. g) Larutan ferro ammonium sulfat (FAS) 0,05 N. Larutkan 19,607 g Fe(NH₄)₂ (SO₄)₂. 6H₂O dalam air suling bebas nitrit, tambahkan 20 mL H₂SO₄ pekat dan tepatkan sampai 1000 mL.
- Larutan induk nitrit, 250 mg/L NO₂-N. Larutkan 1,232 gram NaNO₂ dalam air suling bebas nitrit dan tepatkan sampai 1000 mL. Awetkan dengan 1 mL CHCl₃.
- Larutan kalium permanganat, KMnO₄ 0,05 N. Larutkan 1,6 g KMnO₄ dalam 1000 mL air suling. Biarkan sedikitnya 1 minggu, saring dengan glass wool dan simpan dalam botol berwarna coklat.

Persiapan dan pengawetan contoh uji

Persiapan contoh uji :

- Saring air suling dengan kertas saring bebas nitrit yang berukuran pori 0,45 μm, tampung hasil saringan. Larutan ini digunakan sebagai blanko penyingaran.
- Saring contoh uji dengan kertas saring bebas nitrit yang berukuran pori 0,45 μm.
- Masukkan contoh uji ke dalam botol gelas berwarna gelap bebas dari kontaminasi nitrit.

Pengawetan contoh uji :

Contoh uji disimpan pada pendingin 4 °C dengan waktu simpan tidak lebih dari 48 jam.

Persiapan Pengujian

Pembakuan larutan induk nitrit, 250 mg/L NO₂-N

- a) Pipet 50 mL larutan KMnO₄ 0,05 N, masukkan kedalam erlenmeyer 250 mL.
- b) Tambahkan 5 mL H₂SO₄ pekat.
- c) Pipet 50 mL larutan induk nitrit, masukkan kedalam larutan KMnO₄ dengan cara ujung pipet berada dibawah permukaan larutan KMnO₄
- d) Homogenkan/goyangkan dan panaskan pada temperatur 700 °C sampai dengan 800 °C di atas pemanas.
- e) Hilangkan warna permanganat dengan penambahan larutan natrium oksalat 0,05 N dengan penambahan secara bertahap sebanyak 10 mL.
- f) Titar kelebihan Na₂C₂O₄ dengan larutan KMnO₄ 0,05 N sampai sedikit warna merah muda sebagai titik akhir.

Catatan: Jika digunakan larutan FAS sebagai pengganti Na₂C₂O₄, tidak perlu dilakukan pemanasan tetapi memerlukan waktu reaksi selama 5 menit sebelum titrasi akhir dengan KMnO₄.

- g) Hitung kandungan NO₂-N dari larutan induk dengan rumus berikut:

$$C = \frac{[(V1 \times N1) - (V2 \times N2)] \times 7}{V3}$$

dimana:

C adalah kadar NO₂-N dalam larutan induk, mg /mL NO₂-N; V1 adalah jumlah mL total larutan KMnO₄ yang digunakan; N1 adalah normalitas larutan KMnO₄;

V2 adalah jumlah mL total larutan Na₂C₂O₄ atau jumlah mL total larutan FAS;

N2 adalah normalitas larutan Na₂C₂O₄ (atau jumlah mL total larutan FAS);

V3 adalah jumlah mL larutan induk NO₂-N yang diambil (dititar).

Pembakuan larutan kalium permanganat, KMnO₄ 0,05 N

- Timbang 100 mg sampai dengan 200 mg Na₂C₂O₄ anhidrat, masukkan ke dalam gelas piala 400 mL.
- Tambahkan 100 mL air suling, aduk sampai larut.
- Tambahkan 10 mL H₂SO₄ 1:1.
- Panaskan sampai temperatur 900 °C sampai dengan 950 °C.
- Titrasasi dengan segera dengan larutan KMnO₄ sampai warna merah muda (selama titrasasi temperatur dijaga tidak kurang dari 850 °C).
- Lakukan langkah pada butir c) sampai dengan e) terhadap air suling sebagai blanko.
- Hitung normalitas KMnO₄ dengan rumus:

$$\text{Normalitas KMnO}_4 = \frac{W}{(A - B)(0,33505)}$$

Dimana

W adalah berat Na₂C₂O₄, g;

A adalah volume larutan KMnO₄ untuk titrasasi Na₂C₂O₄, mL;

B adalah volume larutan KMnO₄ untuk titrasasi blanko, mL.

Pembuatan larutan intermedia nitrit, 50 mg/L NO₂-N

- Hitung volume larutan induk nitrit, NO₂-N yang diperlukan untuk membuat 250 mL larutan intermedia nitrit, 50 mg/L NO₂-N.
- Persiapkan larutan intermedia setiap akan digunakan.
- Untuk menghitung larutan intermedia adalah sebagai berikut:

$$(D) \times (C) = (250) \times (50)$$

Dimana

B adalah kadar NO₂-N dalam larutan induk;

C adalah volume larutan induk nitrit yang diperlukan untuk membuat 250 mL, 50 mg/L NO₂-N.

Pembuatan larutan baku nitrit, 0,50 mg/L NO₂-N

- Encerkan 10 mL larutan intermedia dengan air suling sampai volume 1000 mL.

- b) Persiapkan setiap hari atau setiap akan digunakan.

Pembuatan larutan kerja nitrit, NO₂-N

- a) Pipet 0,0 mL; 1,0 mL; 2,0 mL; 5,0 mL; 10,0 mL; 15,0 mL dan 20,0 mL larutan baku nitrit (0,5 mg/L) masing masing ke dalam labu ukur 50 mL.
- b) Tambahkan air suling sampai tepat tanda tera sehingga diperoleh kadar nitrit, NO₂-N 0,00 mg/L; 0,01 mg/L; 0,02 mg/L; 0,05 mg/L; 0,10 mg/L; 0,15 mg/L dan 0,20 mg/L.

Pembuatan kurva kalibrasi

- a) Optimalkan spektrofotometer sesuai petunjuk penggunaan alat.
- b) Ke dalam masing-masing 50 mL larutan kerja tambahkan 1 mL larutan sulfanilamida, kocok dan biarkan 2 menit sampai dengan 8 menit.
- c) Tambahkan 1 mL larutan NED dihidrochlorida, kocok dan biarkan selama 10 menit dan segera lakukan pengukuran absorbansi (pengukuran tidak boleh dilakukan lebih dari 2 jam).
- d) Baca masing-masing absorbansinya pada panjang gelombang 543 nm.
- e) Buat kurva kalibrasinya.

Prosedur

- a) Pipet 50 mL contoh uji, masukkan kedalam gelas piala 200 mL.
- b) Tambahkan 1 mL larutan sulfanilamida, kocok dan biarkan 2 menit sampai dengan 8 menit.
- c) Tambahkan 1 mL larutan NED dihidrochlorida, kocok biarkan selama 10 menit dan segera lakukan pengukuran (pengukuran tidak boleh dilakukan lebih dari 2 jam).
- d) Baca absorbansinya pada panjang gelombang 543 nm.

Perhitungan

Kadar nitrit

- a) Masukkan hasil pembacaan absorbansi contoh uji kedalam kurva kalibrasi.
- b) Kadar nitrit adalah hasil pembacaan larutan konsentrasi contoh uji dari kurva kalibrasi.

Persen temu balik (%Recovery)

Pembuatan *spike matrix*:

- 40 mL contoh uji ditambah 10 mL larutan baku NO₂-N 0,5 mg/L.
- Lakukan langkah pada butir 3.6 b) sampai dengan 3.6 d).

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(E - F)(100\%)}{G}$$

dimana:

- D adalah kadar contoh uji yang di *spike*, mg/L;
E adalah kadar contoh uji yang tidak di *spike*, mg/L;
F adalah kadar standar yang ditambahkan (*target value*), mg/L;

$$G = (y)(z) / v$$

dimana:

- y adalah volume larutan baku yang ditambahkan, mL;
z adalah kadar larutan baku;
v adalah volume akhir contoh uji yang di *spike*, mL.

5. Nitrat (APHA 2017)

Alat-alat :

- Timbangan
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Kertas saring
- Plastic Wrap
- Pipet ukur
- Spektrofotometer UV

Pereaksi :

- Aquadest
- kuprisulfat (CuSO₄)
- Ca(OH)₂
- MgCO₃⁻
- HCl 1 N

Cara kerja :

Pembuatan ekstrak sedimen untuk pengujian nitrat dilakukan dengan tahapan

sebagai berikut:

- 1) Ditimbang 25 g sampel sedimen kering, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 500 mL;
- 2) Ditambahkan 250 mL larutan pengestrak kuprisulfat (CuSO_4), kemudian kocok pada kecepatan 120 rpm selama 10 menit;
- 3) Dibiarkan mengendap selama beberapa menit;
- 4) Enap-taungkan dan larutkan dalam gelas ukur 250 mL;
- 5) Diukur 150 mL larutan tadi dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL yang telah diisi 0,2 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dan 0,5 g MgCO_3 ;
- 6) Dikocok pada kecepatan 120 rpm selama 5 menit dan saring dengan kertas saring, hasil saringan merupakan ekstrak sedimen.

Ekstrak sedimen yang telah dibuat selanjutnya digunakan untuk pengukuran kandungan nitrat dengan menggunakan spektrofotometer UV- Vis dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Disiapkan erlenmeyer 50 mL untuk blanko yang kemudian diisi 25 mL aquades, lalu diberi plastik wrap;
- 2) Disiapkan erlenmeyer 50 mL untuk sampel yang kemudian diisi 25 mL dari hasil ekstraksi, lalu diberi plastik wrap;
- 3) Dipipet 1 mL reagen HCl 1 N ke dalam masing-masing erlenmeyer blanko dan sampel, diberi plastik wrap;
- 4) Larutan blanko dan sampel dimasukkan ke dalam kuvet spektro dan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang 220 nm.

6. Fosfat (SNI 06-6989.31-2005)

Alat-alat:

- Timbangan
- Kertas saring
- Botol kocok
- spektrofotometer UV-Vis
- Tabung reaksi
- Pengekstrak Bray dan Kurt I

- Pengekstrak Olsen

Cara kerja :

Pembuatan ekstrak sedimen untuk pengujian fosfat dengan $\text{pH} < 5,5$ dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- i. Ditimbang 2,5 g sampel sedimen kering;
- ii. Ditambah 25 mL pengekstrak Bray dan Kurt I, kemudian dikocok selama 5 menit;
- iii. Disaring apabila larutan keruh, hasil saringan merupakan ekstrak sedimen.

Pembuatan ekstrak sedimen untuk pengujian total fosfat dengan $\text{pH} > 5,5$ dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Ditimbang 1 g sampel sedimen kering, dimasukkan ke dalam botol kocok;
- 2) Ditambahkan 20 mL pengekstrak Olsen, dikocok selama 30 menit;
- 3) Disaring apabila larutan keruh, hasil saringan merupakan ekstrak sedimen.

Ekstrak sedimen yang telah dibuat selanjutnya digunakan untuk pengukuran kandungan total fosfat dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Dipipet 2 mL ekstrak sedimen ke dalam tabung rekasi;
- 2) Disiapkan deret standar;
- 3) Ekstrak dan deret ditambahkan 10 mL pereaksi pewarna fosfat, dikocok hingga homogen dan dibiarkan 30 menit;
- 4) Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 889 nm.

7. Sulfat (SNI 6989.20:2009)

Alat-alat :

- Spektrofotometer, digunakan pada panjang gelombang 420 nm dengan ukuran kuvet (light path) 1 cm atau 2,5 cm sampai 10 cm atau Nepelometer (turbidimeter);
- Labu ukur 100,0 ml dan 1000,0 ml;
- Pipet volumetrik 5,0 ml; 10,0 ml; 15,0 ml; 20,0 ml; 25,0 ml dan 50,0 ml;
- Labu Erlenmeyer 250 ml atau gelas piala 250 ml;

- Stopwatch;
- Magnetic stirrer atau alat pengaduk mekanis;
- Sendok penakar kapasitas 0,2 ml sampai 0,3 ml; dan
- Timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg.

Pereaksi :

- air bebas mineral;
- kertas saring;
- barium klorida kristal (BaCl_2);
- larutan baku sulfat $100 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L}$ ($1 \text{ mL} = 100 \mu\text{g SO}_4^{2-}$); Larutkan 0,1479 g natrium sulfat (Na_2SO_4) anhidrat dalam air bebas mineral dan encerkan sampai 1000 mL.
- larutan buffer A: Larutkan 30 g magnesium klorida heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 5 g natrium asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 1 g kalium nitrat (KNO_3), dan 20 mL asam asetat pekat (CH_3COOH 99%) dalam 500 mL air bebas mineral dan tepatkan sampai 1000 mL.
- larutan buffer B: Larutkan 30 g magnesium klorida heksa hidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 5 g natrium asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 1 g kalium nitrat (KNO_3), 0,111 g natrium sulfat anhidrat, dan 20 mL asam asetat pekat (CH_3COOH 99%) dalam 500 mL air bebas mineral dan tepatkan sampai 1000 mL.

Persiapan pengujian :

- 1) Pembuatan larutan kerja sulfat Buat deret larutan kerja dari larutan baku sulfat dengan 1 (satu) blanko dan minimal 3 (tiga) kadar yang berbeda secara proporsional dan berada pada rentang pengukuran.
- 2) Pembuatan kurva kalibrasi
 - a) Operasionalkan dan optimalkan spektrofotometer atau turbidimeter sesuai dengan petunjuk penggunaan alat;
 - b) Pindahkan masing-masing 100 ml larutan kerja ke dalam labu erlenmeyer 250 ml atau gelas piala 250 ml;

- c) Tambahkan 20 ml larutan buffer a, aduk dengan alat pengaduk pada kecepatan konstan. Selama pengadukan tambahkan 1 (satu) sendok takar kristal BaCl_2 , pengadukan diteruskan selama 60 ± 2 detik terhitung dari penambahan BaCl_2 ;
- d) Ukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm atau ukur turbiditasnya dengan turbidimeter pada waktu $5 \pm 0,5$ menit;
- e) Buat kurva kalibrasi atau tentukan persamaan garis regresinya.

Prosedur

- 1) pipet 100 mL contoh uji atau sejumlah contoh uji yang telah diencerkan menjadi 100 mL, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL atau gelas piala 250 mL;
- 2) tambahkan 20 mL larutan buffer A, aduk dengan alat pengaduk pada kecepatan konstan. Selama pengadukan tambahkan 1 (satu) sendok takar kristal BaCl_2 , pengadukan diteruskan selama 60 ± 2 detik terhitung dari penambahan BaCl_2 ;
- 3) ukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm atau ukur turbiditasnya dengan turbidimeter pada waktu $5 \pm 0,5$ menit;
- 4) catat serapannya atau turbiditasnya;

Perhitungan :

$$\text{Kadar sulfat (mg SO}_4^{2-}/\text{L)} = C \times f$$

Keterangan:

C = kadar sulfat yang diperoleh dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mg/L

f = faktor pengenceran

Lampiran 3 Hasil Analisis Mikrob

>ASV_41_(4.182%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGGATTCACTGGGCGTACAGGGTGTG
TAGGCGGTTTGGTAAGCCTTCTGTAAAGCTTCGGGCCCAACCCGGAA
AGCGCAGAGGGTACTGCCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATACCTGACGCTGAGACACGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>NZ_CAJNB010000003.1:63897-64149 *Nitrospira defluvii* isolate *Candidatus Nitrospira* sp. ZN2, whole genome shotgun sequence

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGGATTCACTGGGCGTACAGGGTGTG
TAGGCGGTTTGGTAAGCCTTCTGTAAAGCTT

CGGGCCCAACCCGGAAAGCGCAGAGGGTACTGCCAGGCTAGAGGGTG
GGAGAGGAGCGCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTG

AAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCGGCGCTCT
GGAACATACCTGACGCTGAGACACGAAAGCGTG

GGGAGCAAACAGG

>NZ_OUNR01000021.1:53721-53973 *Nitrospira lenta* isolate *N. lenta* BS10, whole genome shotgun sequence

CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGAAATGTTCCAGA
GCGCCGCCTTCGCCACCGGCCTTCCTCCCGA

TCTCTACGCAATTCACCGCTACACCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCAT
CCTCTAGCTGAGCAGTCCCCTCTGCACTTTC

CGGGTTAGGCCCGGAGATTTACGGAGGGCTTACCCAACCGCCTACGC
TCCCTGTACGCCAGTGAATCCGAACAACGCT

TGCCACCTTCGTA

>NZ_CZPZ01000003.1:129006-129258 *Candidatus Nitrospira nitrificans* isolate *COMA2*, whole genome shotgun sequence

CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGAAATGTTCCAGA
GCGCCGCCTTCGCCACCGGCCTTCCTCCCGA

TCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCCAT
CCTCTAGCCGAGCAGTCCCCTCCGCACTTTC

CGGGTTAGGCCCGGAGATTTACGAAGGGCTTACCCAACCGCCTACGC
TCCCTGTACGCCAGTAAATCCGAACAACGCT

TGCCACCTTCGTA

>NZ_LN885086.1:1779460-1779712 *Candidatus Nitrospira inopinata* isolate
ENR4 chromosome 1, complete sequence

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGATTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTC

CGGGCCTAACCCGGAAAGTGCGGAGGGGACTGCTTGGCTAGAGGATG
GGAGAGGAGCGCGGAATTCCCAGGTAGCGGTG

AAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCGGCGCTCT
GGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG

GGGAGCAAACAGG

>ASV_116_(1.178%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGATTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCAGAGGGGACTGCTCAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>NZ_CP011801.1:1275639-1275891 *Nitrospira moscoviensis* strain NSP M-1
chromosome, complete genome

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGATTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTC

CGGGCCTAACCCGGAAAGTGCGAGGGGACTGCTCGGCTTGAGGATG
GGAGAGGAGCGCGGAATTCCCAGGTAGCGGTG

AAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCGGCGCTCT
GGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG

GGGAGCAAACAGG

>ASV_52_(0.934%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCGGAGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>NZ_CZQA0100015.1:65999-66251 *Candidatus Nitrospira nitrosa* isolate
COMA1, whole genome shotgun sequence

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTC

CGGGCCTAACCCGGAAAGTGCGGAGGGGACTGCTCGGCTAGAGGATG
GGAGAGGAGCGCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTG

AAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCGGCGCTCT
GGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG

GGGAGCAAACAGG

>ASV_372_(0.499%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGATAAGCCCTCCGTGAAATCTCCAGGCTTAACCTGGAA
AGTGCAGAGGGGACTGTTTCAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>NZ_LT828648.1:2388528-2388780 *Nitrospira japonica* isolate
Genome sequencing of Nitrospira japonica strain NJ11 chromosome I, complete sequence

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGATAAGCCCTCCGTGAAATCTC

CAGGCTTAACCTGGAAAGTGCAGAGGGGACTGTTTCAGCTAGAGGATG
GGAGAGGAGCGCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTG

AAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGTGGCGAAGGCGGCGCTCT
GGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG

GGGAGCAAACAGG

>ASV_461_(0.224%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_553_(0.208%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCGGGGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_647_(0.245%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCGGAGGGGACTGCTCGGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_672_(0.456%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGGGCGGAGGGGACTGCTCGGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGA
ATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGG
TGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_1156_(0.118%)

TACGAAGGTGGCGAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCACG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCTCTTGGGAAAGCTCCCGGCTTAACCCGGAA
AGGTCGAGGGGA ACTACTCAGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACGTACCTGACGCTGAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_1412_(0.113%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCGGAGGGGACTGCTTGGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_1439_(0.107%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTAGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCGGAGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_1575_(0.315%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTTCGGTAAGCCCTCTGTGAAATCTCCAGGCTTAACCTGGAA
CAGTCGGAGGGGACTGCTGAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_1672_(0.118%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTAGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCAAGAGGGGACTGCTTGGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_1932_(0.209%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCAGGCTTAACCTGGAA
AGTGCAAGAGGGGACTGCTCGGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_2331_(0.075%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGTGTG
TAGGCGGTTTCGGTAAGCCCTCTGGGAAATCTCTGGGCTCAACCCAGAA
AGGTCAGAGGGGACTGCCGTGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACGTACCTGACGCTGAGACACGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_3037_(0.038%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGTGTG
TAGGCGGTTTGGTAAGCCCTCTGTGAAAGCTTCGGGCTCAACCCGGAA
AGCGCAGGGGGGACTGCCAGGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGGA
ATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGG
TGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACGTACCTGACGCTGAGACACGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_3133_(0.178%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTTGGTAAGCCCTCCGGGAAATCTTCGGGCTTAACCCGGAA
AGTTCAGAGGGGACTGCCAGGCTAGAGGACGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACGTTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_3408_(0.049%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTTGGTAAGCCCTCCGTGAAATCTCCAGGCTCAACCTGGAA
AGTGCAGAGGGGACTGCTTAGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_3592_(0.168%)

GACAGAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGTGC
TAGGTGGTTAGGTAAGACCTGTGGGAAAGACCTGGGCTTAACCCAGG
AAGGTCGCAGGTGACTGCCTAGCTAGAGGGCGGGAGAGGAGCGCGGA
ATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGG
TGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACGTTTCTGACACTGAGGCACGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_4965_(0.035%)

TACGAAGGTGGCAAGCGTTGTTTCGGATTCACCTGGGCGTACAGGGAGCG
TAGGCGGTCAGGTAAGCCCTTCGTGAAATCTCCGGGCCTAACCCGGAA
AGTGCGGAGGGGACTGCTTGGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAA
TTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGGT
GGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>ASV_6085_(0.168%)

GACAGAGGTGGCGAGCGTTGTTTCGGAGTTACTGGGCGTAAAGAGCAC
GTAGGCGGCCGGGTAAGTCCCATGTAAAATCCCCCTGCTTAACAGGGG
AACGTCGTGGGTGACTGCCTGGCTAGAGGACGGGAGAGGAGAGCGGA
ATTCCCGGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAGGCCGG
TGCGAAGGCGGCTCTGGAACGTCCTGACGCTGAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGG

>HE793388.1 *uncultured Nitrospira sp.*

AAACAAAACCGCTGGCGGCGCCGCCTAACATTGCAAGTCGAGGAGA
ATCCGGGGCAAGCCGGTAGTAAA

GTGGCAAACGGGGGAGGAATACATGGGTAACCTACCTTGAGAAGGGA
ATAACCCGCCGAAAGTGAGCTAA

TACCCTATACGCTTTACTCTTCATGGAGAGTAAAGGAAAGTTAAGCCG
TGGGCTTGGCACTCAAGGAGGG

GTCATGTCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCTA
CGACGGGTAGCTGGTCTGAGAG

GATGATCAGCCACACTGGCACTGAGATACGGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGAGGAATATTGCG

CAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGT
TTTCGGATTGTAAACCCCTTTTG

TGAGGAAAGATAAAGTGGGTAACCACTTAGACGGTACCTCAAGAAAA
AGCCACGGCTAACTTCGTGCCAG

CAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCGAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGC
GTAAAGAGCACGTAGGCGGTTG

GGTAAGCCTCTTGGGAAAGCTCCCGGCTTAACCGGGAAAGGTGAGG
GGAACTACTCAGCTAGAGGACGG

GAGAGGAGCGCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC
GGGAAGAAGGCCGGTGGCGAAGG

CGGCGCTCTGGAACGTACCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGT

AGTCCACGCCCTAAACGATGTGCACTAAGTGTTCGGCGGTTTACCGCCG
GTGCCGACGCTAACGCAGTAAG

TGCACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG

GAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCCAGGTTG
GACATGCTCGTGGTACGAACCT

GAAAAGGCGAGGACTCTGAAAGGAGAGCGAGCTCAGGTGCTGC

>HM485587.1 *Nitrospira enrichment culture*

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGCGCCTAATACA
TGCAAGTCGAGCGAGAAGGCGG

GGCAACCTGCATGTAAAGCGGCGAACGGGTGAGGAATACATGGGTAA
CCTACCCTCGAGTGGGGAATAAC

CAGCCGAAAGGTTGGCTAATACCGCGTACGCTTCCCGGACTGCGGTTC
GGGAAGGAAAGCGATACCATGG

GTATCGCGCTCAAGGATGGGCTCATGTCCTATCAGCTTGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCTACGA

CGGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGCACTGCGACA
CGGGCCAGACTCCTACGGGAGGC

AGCAGTAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACG
CCGCGTGGGGGATGAAGGTCTTC

GGATTGTAAACCCCTTTCGGGAGGGAAGATGGAACGGGCAACCGTTC
GGACGGTACCTCCAGAAGCAGCC

ACGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGGCAAGC
GTTGTTTCGGATTTACTGGGCGCA

CAGGGAGCGTAGGCGGTTTGGTAAGCCCCTCGGGAAAGCTTCGGGCTT
AACCCGAAAGTTCGGGGGGGA

CTGCCAGGCTAGAGGATGGGAGAGGAGCGCGGAATTCCCGGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATCGGGA

GGAAGGCCGGTGGCGAAGGCGGCGCTCTGGAACATTTCTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCTTAAACGATGGACACTAAG
TGTCGGCGGGTTACCGCCGGTG

CCGCAGCTAACGCAGTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTGAAACTCAAAGGAATTGACG

GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGACGCAACGC
GAAGAACCTTACCCAGGCTGGAC

ATGCAGGTAGTAGGAGGGTGAAAGCCCGACGAGGTAGCAATACCAGC
CTGCTCAGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCCTGTCTTCAGTTGCTACC

GGGTCATGCCGAGCACTCTGGAGAGACTGCCCAGGAGAACGGG

>MT790492.1 *Uncultured Nitrospira sp.*

CAGGCAGCCGTTTGGTGCCACATTGAGCATCACGGGACTCCTCGTCCG
GAAGTGGATCACGATTGTATTT

GCTTGGTATTGGTGGGCTAACTTCCCAGCAAACCTTTGTTATGCCAGCCA
CTATGGTCGGCAGTGCCTGA

TTCTCGACTGTACCCTGCTGCTGACTCGGAGCTGGATGCTCACAGCAA
TATTCGGGGTATGGGCGTTTGC

AATGGTGTTCAACCCAACACAATACGCCATATTTGGTTACAGCCACCA
ACCAGTAGTCGTGGACGGACAG

CTGCTCTCGCTGGCCGACTACATGGGTTTCACCTTTGTTTCGTACAGGGA
CGCCTGAATATATCCGGATCA

TCGAGGTGGGATCGCTCCGTACGTTTCGGCGGG

>LC456850.1 *Uncultured Nitrospira sp.*

ATGCCGCCAGAGGCGTCGCATGTCCAGGCACATCGATCACATCTATTT
CATCCCGATTTTGTTCATCACC

ATCGTCGGAACCTTCCATATGCATACCGACCTTCTGTGCGGAGACTGG
GATTTCTGGATTGATTGGAAGG

ATCGGCAGTGGTGGCCGATCGTGACCCCAGTTACAACAATTACCTTCT
GTGCTGCCCTTCAGTACTACAA

TTGGGTAACTATCGGCAGCCTTTTGGCGCAACCATTACAATTCTGGCA
TATGCATTCCGGCAAGTGGATC

GCGGTATACACTTCGTGGTGGTGGTGGTCTAACTATCCGCCAAACTTC
GTTATGCCTGCGACGTTAATTC

CTGGTGCCTGGTTTTGGACATCACGCTCCTATTGACCAGGAACTGGA
CCATAACGGCTGTTATTGGGGC

ATGGATGTTTGCCATTCTGTTTTACCCAAGCAACTGGCCTATTTTTGGC
TATAGCCACACGCCACTCGTG

GTGGATGGTGCCTGCTCTCATGGGCTGACTACATGGGATTCATGTAT
GTCAGGACCGGGACACCTGAAT

ACATCCGAATGATCGAGGTTGGTTCGCTGCGTACTTTCGGTGGTCACA
GCACCATGATCTCGGCCTTCTT

CTCTGCGITTTGCATCCTCTCTGATGTACGTCCTCTGGTGGCAGTTTGGT
AAGTTCTTCTGTACATCATAAC

TTCTACTTCACGGATGACAGACAGAGAACGGTGAAGGTTTATGACGTC
TTCGCCTACGGC

>NEWT02000001.1 MAG: *Nitrospira* sp.

ACATTCTACGTTTTTCGCGTCAGTCTGTTCCATGCCTGAGAGGGGTGTCT
TTCGGGAGGAGCTCACCTTGC

CGTGATGAATCTTATATACGGATGGCGAGCTGGGAAGAAAGTCAGCTG
ACGTTTCATGATTTATCTCAACG

AAGGGATGACAGGTGGGGAGACGCGTTTCTTCGCCGACATGGAACAG
ACATTCCTACAACATCCCTACCT

GTCTGTAGAGCCGAAAGAAGGGATGGCACTCGTGTTTCATGCATTCCAT
CTGGCATGAAGGTGCTGTCGTA

TCCAGTGGCGAAAAGTATGTGCTGCGCACGGATATCATGTATAGGCAG
GTCTTGAAGCTATAGCCAGGAG

TATTAGGGGGGAGGGAATGCTTATGAAAAACCGTTCGACCCGCCAGG
CATCTTGAATGTATGATCCCAA

TGCTGTCCCATGCGTCTCGATTGAAATGTTGGACATTTTTCACGCTTC
TCCAATGTAGCATTACAAGAC

TTGACGTTTATTAGTCTGCCGTTATGTGAAGGGGCTGCCATACAGCCA
ATTCAGCTGAGTTGCGCGTAGA

AACATCTAGCAGCAAACAATGAACCCCTTAAGCCATTGGATTTATTAT
CCCTGTGCCCACTCTCATTGCT

CCGTAGGTTTGGTTCGAAGAATGCTCTTCCGTTGTATGGACGTTCCGGCC
CTAGGCATCGAACACGATCTC

CCACATAGGTGCGTGTGATAGTCAAAGTGAAACAACCATAGGGTCGTT
CACGAGACGCTCAACGAAAGAT

AATAATCTATGGAAATGCGTTCGACGATTAACGATGTTTCAGCATT
CGTCGACACCACATGACCATCG

TGCTCAGGTGGCATAACCAAGATCAGGTACGAATTGTAGTTGGAAGTGC
AGAAGGTCCGTGCAATGGCTGG

ATCTCTACGGACAAGAATCAGTTCAATTTATCTCAAGAAACCGATTGG
GCCATCAGTTTAAGTCAAATT

CGGTGGATGCCATTTTAGCTGAGCATGTTTGGGAACACCTCGATTGCTT
TGCAGCGGTCTTGGCGGCGCA

GAAGTCTTCGAGTATCTGAAGCCGGGTGGATACATGAGAGTGGCGGT
GCCGGATGGATGGCACCCGAAT

AAAGATTATATTGATTGTGTGAAGCCGGGTGGATGGGGTGAAGGGGC
AAGAGATCATCAGGTAAGTATA

CGTACAGAAGCTTGAGAACAGTATTTGCCTTGGTCCGGTTTGATATTCT
GTTTCTTGAATATTTTGATGA

ACGCAGGGCTTTTCACTATCTGGACTGGTCTCCGGCTGACGGGATGAT
CAAGCGATCGAAACGATTCGAC

AGCAGGAATCTTACTCACGCATTGGCCTATACCTCTATTATTCTAGATG
CCAGAAAACAGTGTAGATGA

TTGAGAGATGCCGGCCCTGTATCACTCCTTCACGGTAACGCTGAGCGG
GTGTTGGCAAACCGACTTTATG

TGAACGAGAATCTTCATCGGACACCTCGCTGCTTCCTTCCCTCCCGTGC
ATCATCTTTTTCTTTCCCAT

AGATTGCCTTCATAACCCCTTGGCGTACGGACTCCTTCTTATTATTCTC
TTTCGCCGAATACCTCGTAGC

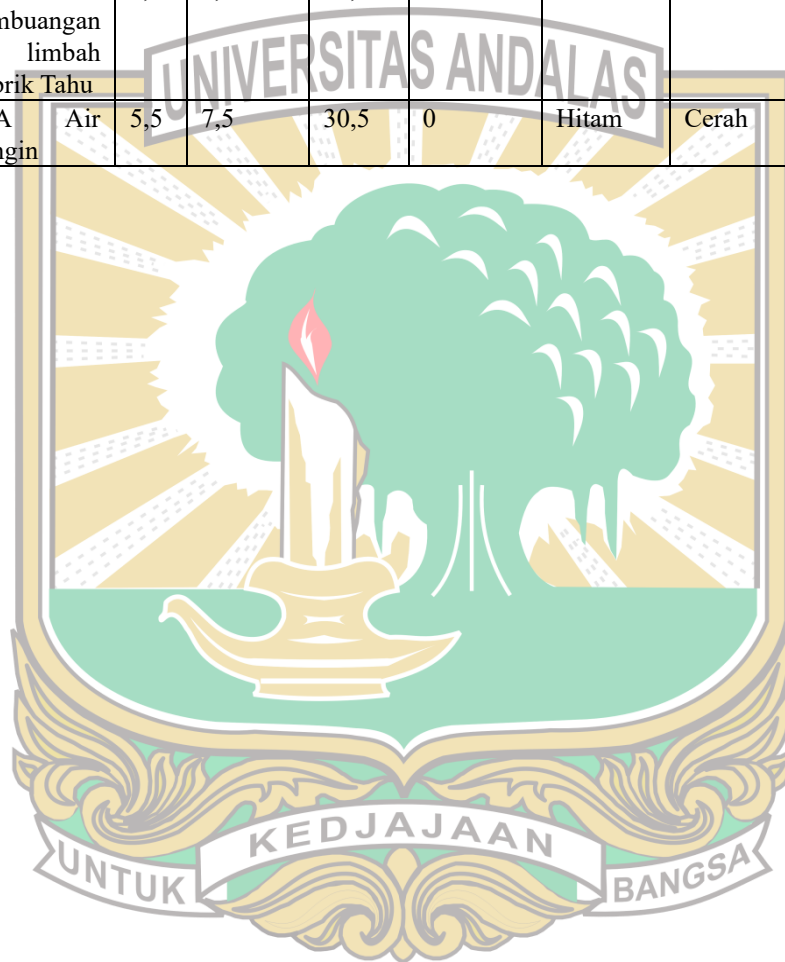
TTCCCGCCTTCGCAGCTGAAGCGACTGCTTCGGCGGAGTAGGCTGCTA
CGGGGATGAAGGCGAGGAGAAC

CCTCCGTAGCCTTGGCGAAGGAGGGTCA



Lampiran 4 Parameter Lapangan

No.	Lokasi Sampling	pH Air	DO (mg/L)	Suhu (°C)	Salinity (ppt)	Warna Air	Cuaca	Titik Koordinat
1.	IPLT	6,8	6,2	34	0,8	Hitam	Cerah	0°53'22" S 100°22'27" T
2.	IPAL Pabrik Karet	6,7	3,9	30	0	Keruh	Cerah	0°57'55" S 100°23'11" T
3.	IPAL RSP UNAND	6,5	2,7	30,4	0,3	Keruh	Cerah	0°54'55" S 100°27'29" T
4.	Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	6,6	2,9	32,1	0	Hitam	Cerah	0°50'9" S 100°19'42" T
5.	TPA Air Dingin	5,5	7,5	30,5	0	Hitam	Cerah	0°49'25" S 100°22'53" T



Lampiran 5 Data Lengkap Hasil Pengukuran

Hasil Pengukuran Konsentrasi TOC

Sampel	Konsentrasi (%)			Konsentrasi Final (%)	Standar Deviasi
	Uji 1	Uji 2	Uji 3		
IPLT	8.449	8.449	8.520	8.472	0.041
Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	5.379	5.378	5.380	5.379	0.001
IPAL RSP UNAND	15.246	15.028	15.149	15.141	0.109
TPA Air Dingin	1.530	1.580	1.665	1.592	0.068
IPAL Pabrik Karet	5.664	5.699	5.744	5.702	0.040

Hasil Pengukuran pH Sedimen

Sampel	Konsentrasi (mg/L)			Konsentrasi Final (mg/L)	Standar Deviasi
	Uji 1	Uji 2	Uji 3		
IPLT	5.6	5.5	5.5	5.5	0.058
Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	5.4	5.2	5.5	5.4	0.153
IPAL RSP UNAND	5.9	5.8	5.6	5.8	0.153
TPA Air Dingin	5.2	5.3	5.2	5.2	0.058
IPAL Pabrik Karet	5.2	5.1	5.1	5.1	0.058

Hasil Pengukuran Konsentrasi Fosfat

Sampel	Konsentrasi (mg/L)			Konsentrasi Final (mg/L)	Standar Deviasi
	Uji 1	Uji 2	Uji 3		
IPLT	194.034	246.310	220.261	220.202	26.138
Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	62.226	54.509	57.630	58.122	3.882
IPAL RSP UNAND	68.363	83.188	55.266	68.939	13.970
TPA Air Dingin	176.441	189.119	185.719	183.760	6.562
IPAL Pabrik Karet	155.876	152.413	158.852	155.714	3.223

Hasil Pengukuran Konsentrasi Amonium

Sampel	Konsentrasi (mg/L)			Konsentrasi Final (mg/L)	Standar Deviasi
	Uji 1	Uji 2	Uji 3		
IPLT	50.947	50.584	53.849	51.793	1.789
Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	27.219	27.144	26.843	27.069	0.199
IPAL RSP UNAND	34.491	32.497	36.179	34.389	1.843
TPA Air Dingin	11.124	11.552	10.160	10.945	0.713
IPAL Pabrik Karet	21.810	21.015	22.492	21.772	0.740

Hasil Pengukuran Konsentrasi Nitrit

Sampel	Konsentrasi (mg/L)			Konsentrasi Final (mg/L)	Standar Deviasi
	Uji 1	Uji 2	Uji 3		
IPLT	1.531	1.612	1.044	1.396	0.307
Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	59.783	60.119	61.197	60.366	0.739
IPAL RSP UNAND	77.835	78.659	77.148	77.881	0.756
TPA Air Dingin	152.906	155.015	152.810	153.577	1.246
IPAL Pabrik Karet	0.698	0.189	1.003	0.630	0.411

Hasil Pengukuran Konsentrasi Nitrat

Sampel	Konsentrasi (mg/L)			Konsentrasi Final (mg/L)	Standar Deviasi
	Uji 1	Uji 2	Uji 3		
IPLT	20.360	20.595	16.894	19.283	2.072
Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	32.485	33.606	30.974	32.355	1.321
IPAL RSP UNAND	48.654	49.151	52.232	50.013	1.938
TPA Air Dingin	42.230	40.911	40.287	41.143	0.992
IPAL Pabrik Karet	20.517	22.506	21.696	21.573	1.000

Hasil Pengukuran Konsentrasi Sulfat

Sampel	Konsentrasi (mg/L)			Konsentrasi Final (mg/L)	Standar Deviasi
	Uji 1	Uji 2	Uji 3		
IPLT	19.32	19.20	19.06	19.194	0.109
Saluran pembuangan air limbah Pabrik Tahu	25.44	25.48	25.29	25.402	0.078
IPAL RSP UNAND	23.45	23.40	22.95	23.266	0.221
TPA Air Dingin	43.01	45.03	42.11	43.385	1.219
IPAL Pabrik Karet	44.00	40.76	41.09	41.950	1.456



Lampiran 6 Dokumentasi



Pengambilan Sampel menggunakan Ekman Grab Sampler.



Analisis pH



Pengeringan Sampel



Analisis TOC



Pengayakan Sampel



Analisis Kandungan Nitrogen dan Fosfat



Sampel yang akan dibawa ke Kanazawa University

PAPER NAME

00-01-Tesis Sodaya Ummi 2024 Fix.docx
_.pdf

AUTHOR

Sodaya Ummi

WORD COUNT

28525 Words

CHARACTER COUNT

179920 Characters

PAGE COUNT

134 Pages

FILE SIZE

1.9MB

SUBMISSION DATE

Aug 14, 2024 2:34 PM GMT+7

REPORT DATE

Aug 14, 2024 2:36 PM GMT+7

● **23% Overall Similarity**

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

- 18% Internet database
- 8% Publications database
- Crossref database
- Crossref Posted Content database
- 13% Submitted Works database

● **Excluded from Similarity Report**

- Bibliographic material
- Cited material
- Small Matches (Less than 8 words)