

# BIOAKUMULASI LOGAM BERAT Cu OLEH *Bacillus* sp

Riesta Primaharinastiti, A. Toto Poernomo, dan Noor Erma S  
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

## ABSTRACT

The research was conducted to investigate the ability of *Bacillus* sp in accumulating Cu and how much it can be accumulated. The medium used to growth the bacterium was Nutrient Broth and Atomic Absorption Spectrophotometry methods was used to assay the Cu, both in the cells and medium. The result of this study showed that *Bacillus* sp incubated in the Nutrient Broth medium containing 10 ppm of Cu, with continuous stirring in the room temperature was able to reduce Cu in the medium 8.912–12.623% and accumulate Cu in the cell 0.1149–0.1400 %/mg cells. Based on this result, it is necessary to develop more studies to find out what factors that influence the accumulation process and to optimize the bioprocess.

**Key words:** Bioaccumulation, *Bacillus* sp., Cu

## PENGANTAR

Semakin pesatnya perkembangan teknologi dan ilmu pengetahuan, terutama di bidang industri, telah membawa dampak yang beragam bagi kehidupan masyarakat baik dampak positif maupun negatif. Dampak positif dari semakin modernnya industri adalah berkembangnya penemuan obat-obat baru, mesin-mesin baru yang canggih, pemanfaatan sumber-sumber alam yang optimal, dan sebagainya. Sedangkan dampak negatif yang menyertainya dan paling dirasakan adalah semakin besarnya pencemaran lingkungan. Banyak industri yang berkembang selama ini, ternyata tidak ramah lingkungan dan menghasilkan limbah yang dapat menyebabkan pencemaran, terutama di lingkungan perairan termasuk pencemaran logam berat karena adanya penambangan, peningkatan penggunaan logam berat dalam berbagai industri, serta adanya limbah industri yang mengandung logam berat yang menjadi penyebab utama terjadinya keracunan logam berat dalam kehidupan masyarakat. Logam berat merupakan senyawa toksik bila berada dalam tubuh manusia di atas ambang konsentrasi tertentu dan hanya dapat ditoleransi pada tingkat mikrogram.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan fakta bahwa mikroorganisme mampu mengakumulasi logam berat sehingga membuka kemungkinan penggunaannya dalam penanganan pencemaran lingkungan oleh logam berat (Crawford and Crawford, 1996). Dalam Crueger and Crueger (1984) dikatakan bahwa logam berat dapat terakumulasi di dalam beberapa jenis bakteri antara lain adalah *Thiobacillus thermophilica*, *Thermothrix thioparus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* dan berbagai macam fungi. Penelitian ini akan menguji apakah *Bacillus* sp, suatu bakteri yang

mudah tumbuh dalam kondisi lingkungan buruk, dapat mengakumulasi logam Cu. Logam Cu dicermati karena logam berat ini akan menyebabkan gangguan kesehatan seperti terhambatnya kerja enzim, nekrosis sel hati, radang ginjal, kolaps, dan perdarahan radang usus akut (Ottoway, 1984) jika berada dalam tubuh manusia di atas ambang yang telah ditetapkan. Tembaga (Cu) merupakan logam berat yang banyak dihasilkan oleh buangan industri pada pembuatan logam campuran seperti kuningan, perunggu, emas, industri cat, industri tekstil, zat warna, dan penyepuhan logam. Untuk menetapkan kadar logam Cu digunakan metode SSA karena mampu secara spesifik menganalisis logam analit baik tunggal maupun dalam campuran, selektif dan sensitif untuk kadar logam renik, serta relatif murah.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Alat-alat yang digunakan di dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer Absorpsi Atom di Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya, Neraca Analitik, Autoklaf, *Shaker incubator* (Modifikasi), Almari pengering (oven), *Laminar Air Flow*, Alat destruksi (*Teflon beaker* dan *hot plate*). Sedangkan bahan yang digunakan adalah *Bacillus* sp (Diperoleh dari Lab. Biologi FMIPA Universitas Airlangga), Media *Nutrient Broth* (Difco), Media *Nutrient Agar*, HCl p.a (Merck), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat p.a (Merck), HNO<sub>3</sub> pekat p.a (Merck), CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O p.a (Merck), KCl p.a (Merck), NaOH p.a (Merck), dan kertas saring Cellulose.

## Penyediaan Inokulum

Dibuat media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 1 L, dituangkan ke dalam tabung reaksi-tabung reaksi sebanyak masing-masing 7 ml, kemudian disterilkan dengan autoklaf

pada suhu 121° C selama 20 menit. Setelah didinginkan, inokulasikan biakan *Bacillus sp* yang berumur 24 jam ke media tersebut dan inkubasi pada suhu kamar.

#### **Pembuatan Media Pertumbuhan Nutrient Broth**

Dibuat media Nutrient Broth sebanyak 1 L, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 20 menit.

#### **Pembiakan Bacillus sp dalam Media Nutrient Broth**

Inokulum *Bacillus sp* dimasukkan dalam Erlenmeyer berisi media *Nutrien Broth* kemudian dikocok pada *shaker incubator* 100 spm pada suhu kamar selama 42 jam.

#### **Pengamatan Pertumbuhan Bacillus sp**

Dimasukkan 1 ml bakteri dalam media *Nutrient Broth* ke dalam media pertumbuhan 100 ml, inkubasi pada suhu kamar, dikocok pada *shaker incubator* 100 spm. Dilakukan pengamatan pertumbuhan *Bacillus sp* setiap 6 jam selama 3 hari. Diambil volume tertentu, diamati *Optical Density* (OD) transmitansinya pada panjang gelombang 650 nm. Kemudian dibuat kurva pertumbuhan bakteri antara serapan dengan waktu inkubasi. Sebagai blanko digunakan media steril.

#### **Induksi sel ke dalam media yang mengandung logam Cu**

Diinokulasikan 1 ml suspensi sel secara aseptis ke dalam media steril yang mengandung Cu 10 ppm, diinkubasikan pada suhu kamar, shaker 100 spm. Sel dipanen pada saat pertumbuhan optimal (fase *stationer*), disaring dengan corong *Buchner* dengan kertas saring *Cellulose* yang telah diketahui beratnya. Sel dan kertas saring kemudian dikeringkan pada suhu 60–70° C hingga diperoleh berat konstan.

#### **Pembuatan Kurva Baku Cu**

Dibuat larutan baku induk Cu 1000 ppm dengan cara menimbang 393 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan dilarutkan dengan  $\text{HNO}_3$  (1,5 ml/L) dalam labu ukur 100 ml, kemudian dari larutan baku induk tersebut dibuat larutan baku kerja 1, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm. Diamati serapannya pada SSA dengan panjang gelombang 324,7 nm dan dihitung persamaan garis regresinya.

#### **Validasi Metode**

##### **Penentuan Linieritas**

Dibuat larutan Cu dalam media dengan kadar tertentu, ditambahkan 16 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan 8 ml  $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4$  (1 : 1), kemudian didestruksi sampai didapat cairan jernih

kekuningan. Sisa asam diuapkan, didinginkan. Diamati serapannya pada SSA dengan panjang gelombang 324,7 nm.

##### **Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi**

Dilakukan pengukuran absorbansi media 10 kali, kemudian dihitung deviasi standarnya. Kalikan hasilnya dengan dua yang merupakan harga batas deteksi dalam serapan. Dibuat beberapa kadar Cu dalam media yang mempunyai serapan yang terletak mendekati batas deteksi. Kadar Cu yang mempunyai serapan sama dengan batas deteksi dalam serapan merupakan kadar batas deteksi (ppm). Batas kuantitasi dinyatakan dengan 5 kali batas deteksi.

##### **Penentuan Presisi**

Dibuat 5 larutan Cu dalam media dengan kadar tertentu, ditambahkan 16 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan 8 ml  $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1), kemudian didestruksi sampai didapat cairan jernih kekuningan. Sisa asam diuapkan, didinginkan. Diamati serapannya pada SSA dengan panjang gelombang 324,7 nm. Dihitung SD dan Koefisien Variasinya.

##### **Penentuan Akurasi**

Dibuat larutan Cu dalam media dengan kadar 4, 6, 8, dan 10 ppm, ditambahkan 16 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan 8 ml  $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1), kemudian didestruksi sampai didapat cairan jernih kekuningan. Sisa asam diuapkan, didinginkan. Diamati serapannya pada SSA dengan panjang gelombang 324,7 nm dan dihitung kadar perolehan kembalinya berdasarkan kurva baku.

##### **Penentuan Kadar Cu dalam Sel**

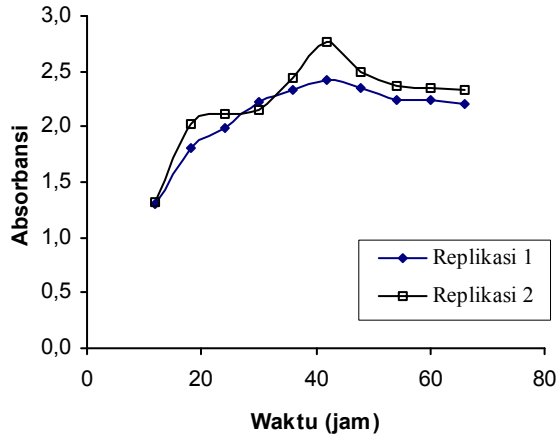
Sel dipanen pada saat pertumbuhan telah mencapai optimal, kemudian disaring menggunakan corong *Buchner* dengan kertas saring *Cellulose* yang telah diketahui beratnya. Kertas saring dan sel dikeringkan di dalam oven pada suhu 60–70° C, kemudian ditimbang dengan teliti hingga beratnya konstan, dimasukkan dalam labu destruksi. Ditambahkan 16 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan 8 ml  $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4$  (1 : 1), kemudian didestruksi sampai didapat cairan jernih kekuningan. Sisa asam diuapkan, didinginkan. Dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml ditambah dengan  $\text{HNO}_3$  pekat 1,5 ml/L sampai garis tanda. Diamati serapannya pada SSA dengan panjang gelombang 324,7 nm.

##### **Penentuan Kadar Cu dalam Filtrat Media**

Filtrat dipipet volume tertentu dan dimasukkan ke dalam labu destruksi. Ditambahkan 16 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan 8 ml  $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4$  (1 : 1), kemudian didestruksi sampai didapat cairan jernih kekuningan. Sisa asam diuapkan, didinginkan. Dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml ditambah dengan  $\text{HNO}_3$  pekat 1,5 ml/L sampai garis tanda. Diamati serapannya pada SSA dengan panjang gelombang 324,7 nm.

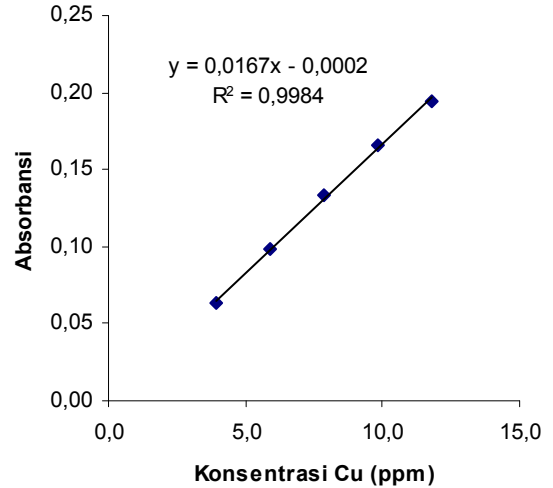
**HASIL**

Berdasarkan pengamatan kerapatan optik suspensi sel dan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* yang diperoleh dalam penelitian ini (Gambar 1), waktu optimal melakukan pemanenan sel adalah 42 jam setelah inkubasi.



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *Bacillus sp*

Tahap validasi metode diperlukan untuk menguji kevalidan atau keterhandalan metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini. Pada uji penentuan linearitas larutan Cu dalam media (Gambar 2) diperoleh suatu persamaan regresi seperti terurai berikut ini.



**Gambar 2.** Kurva Linieritas Cu dalam media

Analisis kuantitatif dalam kadar renik pada umumnya membutuhkan tahap uji akurasi yang dinyatakan dalam % *Recovery*. Analisis sampel biologis dipersyaratkan memiliki nilai % *Recovery* <sup>3</sup> 80%. Data yang diperoleh tercantum dalam Tabel 1.

Hasil perhitungan harga % *Recovery* pada Tabel 1, menunjukkan bahwa metode analisis yang dipakai untuk menentukan kadar logam Cu dalam penelitian ini cukup baik, dengan harga perolehan kembali sebesar 83,593%.

Berdasarkan pengujian parameter-parameter validasi seperti yang terurai di atas, tampak bahwa metode analisis

**Tabel 1.** % *Recovery* Cu

| No | Konsentrasi Cu awal (ppm) | Konsentrasi Cu akhir (ppm) |        |        | % <i>Recovery</i> |
|----|---------------------------|----------------------------|--------|--------|-------------------|
|    |                           | Filtrat                    | Residu | Total  |                   |
| 1  | 9,953                     | 7,851                      | 0,832  | 8,683  | 87,24             |
| 2  | 9,953                     | 7,097                      | 0,775  | 7,872  | 79,10             |
| 3  | 9,953                     | 7,673                      | 0,731  | 8,404  | 84,44             |
| x  | 9,953                     | 7,5403                     | 0,7793 | 8,3197 | 83,593 ± 0,412    |

**Tabel 2.** Penentuan kadar Cu dalam sel

| Replikasi | Berat sel (mg) | Cu dalam larutan |                | % Berat Cu/mg sel | % Cu yang terakumulasi dalam sel |
|-----------|----------------|------------------|----------------|-------------------|----------------------------------|
|           |                | awal (ppm)       | Cu akhir (ppm) |                   |                                  |
| 1         | 81,0           | 9,8075           | 1,042          | 0,12864           | 10,625                           |
| 2         | 86,9           | 9,8075           | 1,078          | 0,12405           | 10,992                           |
| 3         | 85,6           | 9,8075           | 1,184          | 0,13832           | 12,072                           |
| 4         | 75,3           | 9,8075           | 0,874          | 0,11607           | 8,912                            |
| 5         | 84,6           | 9,8075           | 0,972          | 0,11489           | 9,911                            |
| 6         | 88,4           | 9,8075           | 1,238          | 0,14005           | 12,623                           |
| x         | 83,63          | 9,8075           | 1,065          | 0,12700           | 10,8558                          |

**Tabel 3.** Penentuan kadar Cu dalam filtrat

| Replikasi | Cu         |             | % Cu sisa   |
|-----------|------------|-------------|-------------|
|           | Awal (ppm) | Akhir (ppm) |             |
| 1         | 9,8075     | 7,5401      | 76,880      |
| 2         | 9,8075     | 7,0897      | 72,289      |
| 3         | 9,8075     | 6,8690      | 70,038      |
| 4         | 9,8075     | 7,6673      | 78,178      |
| 5         | 9,8075     | 7,3184      | 74,620      |
| 6         | 9,8075     | 8,0922      | 82,510      |
|           |            |             | x = 75,4191 |

yang digunakan untuk analisis kuantitatif Cu dalam penelitian ini sudah cukup baik sehingga metode analisis kuantitatif Cu secara SSA ini dapat diterapkan pada sampel yang akan diuji selanjutnya. Hasil pengujian kadar Cu dalam sel dan filtrat sampel tertera dalam Tabel 2 dan 3 berikut.

## PEMBAHASAN

Kemampuan mengakumulasi logam oleh mikroorganisme ini dipengaruhi oleh faktor-faktor pertumbuhan seperti jumlah oksigen, pH, dan nutrisi khusus. Mekanismenya juga dipengaruhi oleh sifat mikroorganisme dan logamnya, sedangkan prosesnya dapat terjadi pada ekstraseluler, pada permukaan sel, dan intraseluler. Pada ekstraseluler, akumulasi logam dapat disebabkan oleh adanya pembentukan polimer ekstraseluler membentuk kompleks dengan logam. Mekanisme ini terjadi bila logam mengendap dan secara fisik terjebak oleh matriks polimer yang diinduksi oleh kondisi lingkungan atau terjadinya kompleks yang larut. Akumulasi pada permukaan sel merupakan hasil reaksi kompleks antara ion logam dan konstituen dinding sel. Komposisi dinding sel bakteri gram positif, bakteri gram negatif, ragi, jamur, dan alga berbeda. Proses akumulasinya sangat bergantung pada jenis spesies dan kondisi lingkungan. Sedangkan proses akumulasi intrasel memerlukan sistem transport aktif yang sangat spesifik untuk masuknya logam ion pada suatu sel (Shumate and Stranberg, 1985).

Berdasarkan kurva linieritas dan persamaan regresi yang diperoleh, didapatkan harga koefisien korelasi,  $r = 0,9932$ . Harga  $r$  tabel untuk menyatakan adanya korelasi adalah  $0,878$  ( $\alpha = 0,05$ ), menunjukkan adanya hubungan linier antara kadar dengan serapan Cu, sehingga analisis kuantitatif Cu dalam sampel dapat dilakukan dengan metode SSA ini.

Pada uji penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi memberikan hasil perhitungan LD dan LQ masing-masing sebesar  $0,015$  ppm dan  $0,075$  ppm.

Uji presisi dilakukan terhadap larutan Cu dengan kadar 4 dan 12 ppm. Nilai presisi ditunjukkan dari perhitungan harga KV. Harga KV yang diperoleh adalah sebesar  $2,294\%$  untuk konsentrasi larutan Cu 4 ppm ( $3,981$  ppm) dan  $0,925\%$  untuk konsentrasi larutan Cu 12 ppm ( $11,943$  ppm). Meskipun pada larutan Cu dengan konsentrasi 4 ppm KV yang dihasilkan sedikit di atas  $2\%$  namun hal ini masih menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki presisi cukup baik dengan harga KV pada larutan Cu dengan konsentrasi 12 ppm, yang lebih kecil dari  $2\%$ .

Proses akumulasi logam berat dapat berlangsung baik pada kadar logam berat yang kecil, namun jika kadar logamnya terlalu banyak atau besar maka akan mengganggu pertumbuhan sel itu sendiri bahkan dapat menyebabkan kematian sel. Bioakumulasi logam pada kadar/konsentrasi yang rendah lebih bisa diterima sebagai alternatif penyelesaian masalah pencemaran logam berat di lingkungan, oleh karena bila pencemaran tersebut terjadi dengan kadar yang tinggi maka lebih dimungkinkan cara-cara penyelesaian secara kimiawi ataupun fisika. Pengembangan teknologi bioakumulasi dan bioremediasi ini memang pada kenyataannya lebih efisien dan lebih ekonomis untuk "*clean up*" logam dengan konsentrasi/kadar logam pencemar yang rendah.

Pengaruh jumlah logam berat dalam proses akumulasi logam berat barangkali masih membutuhkan penelitian lebih lanjut. Di samping itu kondisi lingkungan pertumbuhan bakteri juga perlu untuk dioptimasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses biodegradasi telah diketahui antara lain jenis logam, suhu, adanya air, pH, adanya senyawa-senyawa toksik yang lain dan jenis tanahnya.

Berdasarkan hasil penentuan kadar Cu yang terdapat dalam filtrat sampel maupun residu sel pada penelitian ini, tampak bahwa jumlah Cu yang diperoleh kembali lebih kecil dari jumlah Cu mula-mula yang ada di media. Adanya selisih ini adalah karena panjang dan rumitnya proses preparasi sampel sehingga dimungkinkan terjadi kehilangan analit. Namun di dalam analisis renik dan biologis, perolehan

kembali masih diizinkan hingga tidak kurang dari 70%, dengan demikian hasil yang diperoleh dalam penelitian ini masih memenuhi persyaratan.

Mekanisme akumulasi logam berat oleh mikroorganisme dipengaruhi oleh sifat-sifat mikroorganismenya sendiri dan juga jenis logam berat yang diakumulasi. Proses akumulasi pada umumnya dapat terjadi secara ekstraseluler, pada permukaan sel dengan membentuk ikatan ion logam dengan permukaan sel, maupun uptake logam intraseluler dan vaporisasi logam, pengendapan logam melalui pembentukan kompleks dengan ligand yang dibentuk oleh mikroba. Mekanisme mana yang terjadi pada proses akumulasi logam berat Cu oleh sel bakteri *Bacillus sp* belum dapat ditentukan dalam penelitian ini, sehingga masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut, namun demikian seperti telah diketahui logam berat dapat menghambat berbagai proses seluler dan efeknya seringkali tidak dipengaruhi oleh konsentrasinya. Toksisitas logam pada mikroba secara umum melibatkan reaktivitas kimiawi yang spesifik. Logam-logam seperti Cu, Ag, Hg sering kali sangat toksik terutama dalam bentuk ionnya sedangkan logam-logam seperti Pb, Ba, dan Fe lebih dapat diterima pada level khusus oleh mikroba. Logam berat meski tidak secara esensial dibutuhkan tetapi dapat diambil dari larutan melalui berbagai mekanisme seperti pertukaran ion pada dinding sel, reaksi pembentukan kompleks pada dinding sel, dan reaksi pembentukan kompleks intra serta ekstraseluler dan biomasnya secara aktif dapat mengadsorpsi logam dalam bentuk gugus-gugus ionik pada permukaan sel dan lapisan polisakarida yang umum didapatkan pada bakteri, jamur, dan alga (Talley and Sleeper, 1997).

Analisis data secara statistika diperlukan untuk mengetahui apakah kadar Cu dalam media sebelum dan setelah induksi sel memiliki perbedaan yang signifikan, yang menunjukkan adanya logam Cu terakumulasi di dalam sel. Uji Statistika yang digunakan untuk analisis data adalah uji *t* rancangan dua kelompok berpasangan (*Pooled t Test*). Harga *t* tabel adalah 2,015 sedangkan harga *t* hitung adalah 13,352, sehingga harga *t* hitung yang diperoleh lebih besar dari harga *t* tabel. Berdasarkan data tersebut maka dapat dinyatakan  $H_0$  ditolak dan  $H_a$  diterima, berarti ada perbedaan bermakna kadar Cu antar perlakuan. Disimpulkan bahwa bakteri *Bacillus sp* mampu mengakumulasi logam berat Cu.

Pada akhirnya penggunaan biomassa mikroorganisme, eksopolisakarida, *biosurfactant*, *bioemulsifier*, *siderophore*, dan mikroba yang mampu menginduksi oksidasi-reduksi serta metilasi, menawarkan berbagai alternatif untuk treatment logam berat pada lingkungan yang tercemar. Alternatif riset di masa depan, dalam hal ini “*in situ mining*” untuk mereduksi limbah yang terkontaminasi dan pengembangan aplikasinya untuk membersihkan logam berat dari limbah industri dan pertambangan sebelum dibuang ke lingkungan dapat dipertimbangkan. Selanjutnya pengembangan teknologi remediasi menggunakan mikroorganisme memerlukan riset lebih lanjut yang lebih spesifik agar dapat diaplikasikan untuk kepentingan masyarakat dan umat manusia pada umumnya.

Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa *Bacillus sp* dalam media cair *Nutrient Broth*, pada suhu kamar dengan lama inkubasi 42 jam mampu menurunkan kadar Cu dalam filtrat media sebesar 8,912–12,623% dari kadar Cu awal, dengan nilai rata-rata sebesar 10,8558%. Kemampuan mengakumulasi logam berat Cu dalam media sebesar berat per berat sel kering 0,1149–0,1400 %/mg sel, dengan nilai rata-rata sebesar 0,1270%/mg sel.

Dengan hasil penelitian yang telah diperoleh maka masih diperlukan adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui faktor-faktor yang berpengaruh dalam proses akumulasi logam berat Cu oleh *Bacillus sp*, seperti pH, suhu, dan juga kemungkinan kemampuan *Bacillus sp* dalam mengakumulasi logam-logam berat lain.

## KEPUSTAKAAN

- Crawford RL and Crawford DL, 1996. *Bioremediation: Principles and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Crueger W and Crueger A, 1986. *Leaching in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 284–7.
- Ottoway JH, APP DK, 1984. Baillieres “*Concise Medical Text Book*”, 4<sup>th</sup> ed. Baillier Tyndall, London. 37.
- Shumate SE and Stranberg GW, 1985. *Accumulation of Metal by Microbial Cells*, *Comprehensive Biotechnology*, Vol. V, Pergamon Press, Oxford. 235–47.
- Talley JW and Sleeper PM, 1997. *Roadblocks to the Implementation of Biotreatment Strategies*, dalam Rakesh KB dan Mark EZ (ed). *Bioremediation of Surface and Subsurface Contamination*, The New York Academy of Sciences, New York.

Reviewer: **Dr. Ir. Tini Surtiningsih, DEA**