

**BIOSORPSI DAN REDUKSI KROM LIMBAH PENYAMAKAN KULIT  
DENGAN BIOMASSA *Fusarium sp* DAN *Aspergillus niger*  
(*Biosorption and Reduction of Chromium Bearing Tannery Wastewater Using the  
Biomass of Fusarium sp. and Aspergillus niger*)**

**Suharjono Triatmojo\*, D.T.H. Sihombing\*\*, S. Djojowidagdo\*,  
T. R. Wiradarya\*\***

\* Fakultas Peternakan, UGM, Yogyakarta

\*\* Fakultas Peternakan, IPB, Bogor

**Abstrak**

Tujuan penelitian ini ialah untuk membuktikan bahwa biomassa *Fusarium sp* dapat mereduksi Cr(VI), dan biomassa *Aspergillus niger* dapat digunakan untuk mengambil ion krom dari larutan. *Fusarium sp* ditumbuhkan pada media cair kentang dektrosa cair, ditambah  $K_2Cr_2O_7$  atau *sludge* limbah penyamakan kulit. Selanjutnya diamati perubahan warnanya, bila terjadi perubahan warna dari *oranye* ke *ungu* atau tak berwarna maka telah terjadi reduksi krom valensi VI menjadi krom valensi III. *Aspergillus niger* ditumbuhkan pada media *Potato dextrose agar (PDA)* padat, dipindahkan ke media cair yang berisi bacto pepton, bacto dektrose dan mikronutrien. Produksi biomassa dilakukan pada labu erlenmeyer; setelah 5 hari dipanen dan dibuat bubuk. Bubuk ini digunakan untuk mengambil krom dari larutan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biomassa *Fusarium sp* dapat digunakan untuk mengambil krom dari larutan yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  atau *sludge* limbah penyamakan kulit. Waktu inkubasi yang lebih lama meningkatkan absorpsi krom oleh biomassa *Fusarium sp*. *Fusarium sp* mampu mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III). Biomassa *Aspergillus niger* dapat digunakan untuk mengambil krom dari larutan. Hasil terbaik diperoleh pada konsentrasi awal 100 mg/l, pada pH 2,0, berat biomassa 0,1 g, dan waktu kontak 12 jam, yaitu 96,23% untuk Cr(III) dan 96,30% untuk Cr(VI). *Fusarium sp* dan *A. niger* dapat digunakan sebagai bioremediator dalam penanganan limbah penyamakan kulit secara biologi.

Kata kunci: biosorpsi, reduksi, krom, *sludge* limbah penyamakan kulit, *Fusarium sp*, *Aspergillus niger*.

**Abstract**

The objective of this research was to study the biosorption and reduction of chromium bearing tannery wastewater using biomass of *Fusarium sp* and *Aspergillus niger*. The study used two species of fungi, i. e *Fusarium sp* and *Aspergillus niger*. *Fusarium sp* was used to investigate bioaccumulation and reduction of chromium in  $K_2Cr_2O_7$  solution and solution containing sludge of leather tanning waste, and *Aspergillus niger* was used to investigate biosorption of Cr(III) and Cr(VI) in solution. *Fusarium sp* was grown on sterilized potato dextrose liquid medium, added with  $K_2Cr_2O_7$  solution or sludge of leather tanning waste solution. Chromium content of *Fusarium sp* biomass was determined by diphenyl carbazide method. *Aspergillus niger* was grown in potato dextrose agar

(PDA) solid medium for 5 days and then transferred to liquid medium containing bacto dextrose, bacto pepton and micronutrien. The biomass was dried, and then ground and sieved at 150  $\mu$ m. The powder was used to remove Cr(III) and Cr(VI) from solution. The result indicated that *Fusarium sp* biomass could be used to remove chromium from solution containing  $K_2Cr_2O_7$ , or sludge of leather tanning waste. Longer incubation time increased chromium absorption by *Fusarium sp* biomass. *Fusarium sp* was able to reduce Cr(VI) to Cr(III). The biomass of *Aspergillus niger* could be used to remove chromium from solution. The best result was obtained from 100 mg/l initial concentration of chromium, pH 2.0, 0.1 g biomass weight, and 12 hours contact time, i.e. 96.23% for Cr(III) and 96.30% for Cr(VI), respectively.

**Key words:** bioaccumulation, biosorption, reduction, chromium, sludge of leather tanning waste, *Fusarium sp*, *Aspergillus niger*.

### I. PENDAHULUAN

#### A. Latar Belakang

Penyamakan kulit menghasilkan limbah padat, cair dan gas. Limbah padat dan cair mengandung krom valensi 6 atau Cr(VI) dan krom valensi 3 atau Cr(III). Cr(III) bersifat kurang toksik, kelarutannya rendah, tidak mobil dan lebih sulit menembus dinding sel tanaman maupun hewan. Cr(VI) sangat toksik, bersifat karsinogenik dan mutagenik. Di alam logam krom, baik Cr(VI) maupun Cr(III), dapat mengalami transformasi bila kondisi lingkungannya sesuai. Logam krom ini pada limbah padat (*sludge*) terdapat dalam jumlah yang sangat tinggi (90%), sedangkan pada larutan sekitar 10% dari krom yang terdapat dalam limbah. *Sludge* limbah penyamakan kulit karena kandungan unsur haranya masih cukup tinggi, sering digunakan untuk memupuk tanaman pertanian. Kandungan logam Cr yang tinggi sangat membatasi penggunaan *sludge* sebagai pupuk ataupun pembenah tanah. Penggunaan *sludge* sebagai pupuk ataupun pembenah tanah sangat berbahaya karena Cr(III) yang terkandung di dalamnya di dalam tanah dapat berubah secara spontan menjadi Cr(VI) yang sangat toksik. Krom, baik Cr(VI) maupun Cr(III), dapat masuk ke dalam tanaman, hewan dan manusia. Penelitian Triatmojo (1999) dan (2000) menunjukkan bahwa logam krom dapat diabsorpsi oleh tanaman caisin dan kacang tanah. Hijauan yang kandungan kromnya tinggi

bila diberikan kepada ternak juga dapat membahayakan organ tubuhnya, karena krom dapat terdeposisi di dalam hati, ginjal, daging dan jaringan tubuh lainnya. Penelitian Triatmojo (2000) menunjukkan bahwa logam krom yang terlarut (misalnya yang terdapat pada limbah cair) lebih berbahaya daripada yang terdapat di dalam *sludge* karena yang terlarut lebih mudah masuk ke dalam tanaman. Ini tidak berarti bahwa yang terdapat di dalam *sludge* tidak berbahaya karena yang terdapat di dalam *sludge* juga ada yang dalam bentuk terlarut, meskipun jumlahnya cukup rendah (1-5%).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa biomassa jamur dapat digunakan sebagai biosorben untuk mengambil ion logam berat dari larutan (Gadd, 1992; Kapoor & Viraraghavan, 1998). Biomassa jamur *A. niger* dapat digunakan untuk mengambil ion Ni, Pb, Cu, dan Cd dari larutan (Kapoor & Viraraghavan, 1998), tetapi belum pernah digunakan untuk mengambil ion Cr(VI) dan Cr(III) dari larutan. Cr(VI) dapat direduksi dengan proses pengomposan, ini diduga dilakukan oleh jamur benang (Triatmojo, 2001). Identifikasi dan uji resistensi jamur pada kompos menunjukkan bahwa jamur *Fusarium sp* dan *Aspergillus niger* cukup resisten terhadap krom. Oleh karena itu ingin dibuktikan bahwa kedua macam jamur benang tersebut dapat digunakan untuk mengasorpsi dan mereduksi krom dari larutan sehingga nantinya dapat digunakan sebagai bioremediator dalam penanganan limbah kulit secara biologi.

## B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dikerjakan dengan tujuan untuk mempelajari biosorpsi dan reduksi krom pada limbah penyamakan kulit menggunakan biomassa jamur benang *Fusarium sp* dan *Aspergillus niger*.

## C. Manfaat Penelitian

Diharapkan dapat diperoleh penanganan limbah penyamakan kulit secara biologi menggunakan jamur *Fusarium sp* dan *Aspergillus niger*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

Penyamakan kulit menggunakan logam krom valensi tiga dalam bentuk garam krom (krom sulfat) ataupun oksidanya (krom oksida). Cr(III) relatif tidak berbahaya dan keterlarutannya rendah dibandingkan dengan Cr(VI) (Wang & Xiao, 1995). Cr(III) tidak mudah diserap oleh tanaman karena keterlarutan dan mobilitasnya yang rendah pada tanah pH tinggi (Macchi *et al.*, 1991, Rutland, 1991). Pada pH di atas 4 Cr(III) membentuk presipitat Cr (OH)<sub>3</sub> (Manahan, 1992). Cr(III) dalam jumlah yang kecil merupakan logam yang esensial untuk metabolisme karbohidrat dan lemak baik pada ternak maupun manusia (Rutland, 1991 dan Manahan (1992). Menurut Macchi *et al.* (1991) adanya ligan organik di tanah dan kondisi asam akan meningkatkan mobilitas Cr(III) sehingga dapat diserap tanaman. Cr (III) akan teroksidasi oleh oksidator yang cocok seperti MnO<sub>2</sub> (Macchi *et al.*, 1991) dan Ca(OH)<sub>2</sub> membentuk senyawa bikromat (Winter, 1985) yang bersifat sangat toksik dan lebih mobil (Macchi *et al.* 1991). Cr(VI) sering dijumpai pada limbah penyamakan kulit yang menggunakan kapur untuk mengendapkan limbah penyamakan. Cr(VI) dikenal sangat toksik, mudah larut, reaktif, mutagenik dan karsinogenik (Manahan, 1991; Wang & Xiao, 1995; Balamurugan, *et al.*, 1999).

Cr(VI) dikenal sebagai oksidator yang kuat dan mampu bergerak menembus dinding membran biologis (Losi & Frankenberger, 1993). Cr(VI) di dalam sel berikatan dengan protein intrasel dan berinteraksi dengan asam nukleat (Losi & Frankeberger, 1993). Toksisitas Cr(VI) diyakini karena reduksi Cr(VI) dapat merusak molekul protein dan ikatan silang DNA, dan reduksi Cr(VI) memerlukan bioreduktor yang menginduksi pembentukan ikatan silang pada molekul DNA. Reduksi Cr(VI) dapat dikerjakan baik oleh bakteri, yeast maupun jamur (Gadd, 1992). Reduksi senyawa kromat oleh mikrobial biasanya dilakukan secara enzimatis (Wang & Xiao, 1995), yaitu oleh kromat reduktase (misal, *E coli*). Reduksi kromat ditandai dengan berubahnya warna *orange* atau kuning menjadi hijau sampai *ungu* atau menjadi tidak berwarna (Wang & Xiao, 1995). Reduksi kromat di dalam tubuh hewan ataupun manusia bersifat toksik, sedangkan yang terjadi di lingkungan yang dilakukan oleh oksidator anorganik maupun mikrobial bersifat detoksifikasi (Ning & Grant, 1999).

Logam krom dapat diabsorpsi baik oleh tanaman tingkat rendah maupun tinggi (Grubinger *et al.* 1994). Tanaman tingkat rendah misalnya alga (Grubinger *et al.*, 1994), sedangkan tanaman tingkat tinggi Caisin atau *Brassica chinensis* (Triatmojo, 1999) dan kacang tanah (Triatmojo, 2000). Sebaliknya, menurut Money (1991) logam krom di tanah sukar diabsorpsi oleh tanaman karena keterlarutannya rendah dan terikat pada partikel lempung. Pengambilan ion logam berat dari limbah cair perlu dilakukan karena toksisitasnya sangat berbahaya bagi kehidupan air dan manusia. Ion logam berat biasanya diambil dengan cara presipitasi, tukar ion dan *reverse osmosis* (Gadd, 1992; Kapoor & Viraraghavan, 1995). Metode ini mempunyai beberapa kelemahan antara lain ion logam yang diambil tidak dapat diprediksi, memerlukan banyak reagen, dan menghasilkan *sludge* dalam jumlah yang sangat besar (Kapoor *et al.*, 2000). Oleh karena itu, perlu dicari teknologi baru untuk

mengambil ion logam berat dari larutan. Ada banyak cara pengambilan logam berat dengan menggunakan mikroorganisme. Proses biologi untuk mengambil ion logam dari larutan dapat dibagi menjadi tiga: (1) adsorpsi logam pada permukaan sel mikroorganisme; (2) penyerapan ion masuk ke dalam sel; dan (3) transformasi kimia ion logam oleh mikroorganisme (Gadd, 1992, Kapoor & Viraraghavan, 1995; Sag & Kutsal, 2000). Menurut Kapoor dan Viraraghavan (1995) bakteri, jamur dan alga dapat mengikat ion logam beracun.

Pengambilan ion logam berat dapat terjadi di bagian luar sel maupun di bagian dalam struktur sel. Metode pengambilan ion logam berat yang tidak tergantung pada siklus metabolisme sel disebut biosorpsi atau pengambilan ion logam secara pasif, sedangkan yang tergantung pada siklus metabolisme dan masuk ke dalam sel disebut bioakumulasi atau penyerapan secara aktif. Pengambilan ion logam oleh mikroorganisme hidup dapat terjadi secara aktif maupun pasif. Pengambilan ion logam berat oleh sel hidup dipengaruhi oleh lamanya kontak, pH larutan logam, kondisi kultur, konsentrasi awal ion logam, dan konsentrasi sel dalam larutan (Kapoor & Viraraghavan, 1995; Gadd, 1992).

Biomassa mikroba mati dapat digunakan untuk mengambil ion logam dari larutan, dengan efisiensi yang sama, lebih besar ataupun lebih kecil daripada biomassa mikroba hidup (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Menurut Sag & Kutsal (2000) biomassa mikroba mati mempunyai kemampuan menyerap ion logam lebih tinggi daripada yang hidup. Sel jamur hidup dan yang telah mati mampu menyerap ion logam berat dari larutan (Gadd, 1992; Kapoor *et al.*, 2000; Sag & Kutsal, 2000). Penggunaan sel mati mempunyai beberapa keuntungan, yaitu: sistem tidak terpengaruhi oleh toksisitas logam berat, tidak memerlukan medium pertumbuhan dan nutrisi, dan ion logam yang terserap mudah didesorpsi (Kapoor & Viraraghavan, 1995).

Pengambilan ion logam berat dengan jamur merupakan pilihan untuk mengambil ion logam berat dari limbah cair. Biomassa jamur mudah diperoleh dalam jumlah yang cukup besar dari industri fermentasi, misalnya produksi enzim, alkohol dan asam asetat. Jamur juga mudah tumbuh pada berbagai media yang murah dan teknologi fermentasinya sederhana. Oleh karena itu, jamur merupakan biomassa yang murah dan mudah didapat serta ekonomis untuk mengambil ion logam berat dari larutan. Jamur genus *Rhizopus* dan *Penicillium* telah dilaporkan sebagai biomassa yang sangat potensial untuk mengambil ion logam dari larutan (Gadd, 1990, Kapoor & Viraraghavan, 1995, Sag & Kutsal, 1996a, Yesim Sag & Kutsal, 1996b, dan Sag *et al.*, 1998), tetapi penelitian tentang pengambilan logam krom menggunakan biomassa *Fusarium sp* dan *Aspergillus niger* masih sangat sedikit. *Aspergillus niger* dapat menyerap uranium dan thorium sebesar 21.5% dan 18,5% berat kering (Gadd, 1990). Kapoor dan Viraraghavan (1998) memperlihatkan bahwa *Aspergillus niger* mampu menyerap logam Pb, Cd, Cu dan Ni dari larutan secara efektif, tetapi belum pernah melakukan penelitian penggunaan biomassa *A. niger* untuk mengambil ion krom dari larutan.

### III. LANDASAN TEORI DAN HIPOTESIS

#### A. Landasan Teori

Penyamakan kulit hanya menggunakan Cr (III) saja, tetapi bila bertemu dengan oksidator yang sesuai (misalnya MnO<sub>2</sub>) dapat teroksidasi menjadi Cr(VI) yang sangat toksik. Baik Cr(VI) maupun Cr(III) dapat diambil oleh biomassa jamur, baik secara pasif maupun aktif. Pada biomassa hidup, biosorpsi dapat dilakukan secara pasif maupun aktif. Logam krom akan terikat pada gugus fungsional seperti amina, fenol dan karboksilat. Membran sel jamur bersifat permeabel, Cr(VI)-karena molekulnya

lebih kecil dari Cr(III) dan bersifat reaktif dan mobil-mampu menembus membran sel, sedangkan Cr(III) akan meningkat keterlarutannya bila terdapat ligan organik, dan akan masuk ke dalam sel. Di dalam sel Cr(VI) akan mengalami transformasi kimia, yaitu perubahan valensi dari 6 menjadi 3 oleh aksi enzim kromat reduktase. Transformasi ini pada jamur yang tidak resisten akan mengganggu metabolisme, karena krom merusak protein DNA sehingga akan terjadi keracunan. Tidak semua Cr(VI) dapat direduksi menjadi Cr(III). Bila jumlah Cr(VI) sangat besar maka akan diisolasi pada vakuola, atau dikeluarkan lagi sehingga tidak mengganggu metabolisme sel, dan tidak menyebabkan keracunan.

#### B. Hipotesis

1. Biomassa *Fusarium sp.* dapat mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) dalam larutan yang mengandung logam krom.
2. Biomassa *Fusarium sp.* dapat digunakan untuk mengambil logam Cr dari larutan.
3. Biomassa *Aspergillus niger* dapat digunakan untuk mengambil logam Cr(VI) dan Cr(III) dari larutan.
4. Biomassa *Fusarium sp.* dan *Aspergillus niger* dapat digunakan sebagai bioremediator dalam penanganan limbah penyamakan kulit secara biologi.

#### C. Materi dan Metode

Penelitian ini dikerjakan di Laboratorium Bioteknologi PAU-UGM, Jurusan Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan, UGM, Yogyakarta dan Laboratorium Biosystem, University of Tsukuba, Jepang. Penelitian dilakukan mulai bulan Januari sampai dengan Agustus 2000.

#### D. Materi dan Alat Penelitian

Materi utama yang digunakan di dalam penelitian adalah jamur *Fusarium sp.* dan *Aspergillus niger* yang diisolasi dan telah diuji resistensinya terhadap logam Cr(VI) pada penelitian sebelumnya,  $K_2Cr_2O_7$ , dan *sludge*

limbah penyamakan kulit yang diperoleh dari pabrik penyamakan kulit Budimakmur Jaya Murni, Yogyakarta.

Bahan kimia yang digunakan adalah  $HNO_3$ , HCl, NaOH,  $H_2SO_4$ ,  $CrCl_3$  standar,  $K_2Cr_2O_7$  standar, NaCl,  $CaCl_2 \cdot H_2O$ , KCl,  $K_2HPO_4$ ,  $NaHCO_3$ ,  $MgSO_4$ ,  $Fe(SO_4)_2 \cdot 7H_2O$ , difenil karbazid,  $H_2O_2$ ,  $H_3PO_4$ , Natriumazida, reinst ( $NaN_3$ ), buffer fosfat, kertas saring Whatman No. 1, Whatman 40, Reagen Tween 80, Bacto dektrosa, Bacto pepton, agar, Medium PDA (bacto), air murni serta akuades.

Alat yang digunakan adalah autoklaf merek Tommy, *laminar* UV, kawat ose, spektrofotometer UV-1601 PC UV-visible, spektrofotometer merek Shimadzu, AAS Shimadzu AA-6800, pH meter WTW pH 90 dengan elektrode tipe ESO, oven merek Memmert, lemari pendingin merek National, timbangan digital merek Acculab kapasitas 200g, timbangan analitik merek Sartorius kapasitas 150g, Tanur merek Memmert, sentrifus, *shaker* orbital, filter vakum, mikropipet, gelas beaker, labu erlenmeyer, penyaring berbagai ukuran, pipet ukur, labu ukur berbagai ukuran, gelas ukur, dan cawan petri.

### IV. METODE PENELITIAN

#### A. Percobaan Reduksi dan Biosorpsi Krom oleh *Fusarium sp.*

Prakultur jamur benang diinkubasikan di dalam media yang mengandung krom ( $K_2Cr_2O_7$ ) selama 7 hari. Hasil pengamatan secara visual pada warna kultur yaitu adanya perubahan warna oranye (krom valensi 6) menjadi hijau atau ungu (krom valensi 3). Perubahan warna media menunjukkan telah terjadinya reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III). Percobaan biosorpsi dilakukan dengan cara menanam isolat jamur *Fusarium sp.* ke dalam media kentang dektrosa cair yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  atau *sludge* limbah penyamakan kulit dengan konsentrasi 100 mg/l. Media dan biomassa ditumbuhkan pada suhu kamar, di atas penggojok orbital

dengan putaran 125 rpm selama 8 hari. Pemanenan dilakukan pada hari ke-4 dan ke-8. Kandungan krom yang tidak diikat oleh jamur dapat ditentukan dengan metode difenil karbasid (Anonim, 1976).

#### B. Penentuan Kadar Cr Total, Cr(VI) dan Cr(III).

Penentuan kadar krom total, Cr(VI) dan Cr(III) dilakukan dengan metode difenil karbazid (Anonim, 1976). Kandungan Cr(VI) ditentukan dengan cara sebagai berikut: sampel diencerkan dengan perbandingan 1:5 atau 1 bagian sampel diencerkan dengan lima bagian asam sulfat. Sampel dibuat 100 ml, ditambah  $\text{HNO}_3$  (pH 1)  $\pm$  3 tetes dan ditambah difenil karbazid 2 ml, ditunggu 10-15 menit atau hingga warna ungu. Selanjutnya diambil subsampel untuk dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer Shimadzu pada panjang gelombang 540 nm.

Cr total ditentukan dengan cara sebagai berikut: sampel dilarutkan di dalam akuades steril, ditambah  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N sebanyak 3-4 ml dan dilanjutkan dengan penambahan  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% sebanyak 3 ml dan diberi batu didih. Dididihkan beberapa saat, kemudian ditambah  $\text{KMnO}_4$  1N setetes demi setetes sampai terbentuk warna  $\text{KMnO}_4$  yang konstan yaitu kuning kecoklatan. Selanjutnya, volume dibuat seperti semula. Pemanasan dilanjutkan selama 2 menit, ditambahkan 1 ml  $\text{NaN}_3$  dan terus dipanaskan. Apabila warna kuning kecoklatan tidak berubah dengan pemanasan 30 menit, dapat ditambahkan lagi 1 ml  $\text{NaN}_3$ . Pemanasan dilanjutkan sampai mendidih selama 1 menit, hingga warnanya hilang. Larutan kemudian didinginkan dan ditambahkan 5 tetes (0,25 ml)  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Larutan yang sudah dingin dipindahkan ke dalam gelas ukur 100ml dan diencerkan sampai tanda batas. Ditambahkan 2 ml tarutan difenil karbazid, dicampur hingga homogen, didiamkan 10-15 menit sampai warna tetap. Diperiksa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kadar Cr(III) dihitung dengan mengurangkan kadar Cr(VI) dari krom total (Anonim, 1976).

#### C. Percobaan Biosorpsi Cr(VI) dan Cr(III) dengan Biomassa *A. niger*

Produksi biomassa *A. niger*. *Aspergillus niger* di dalam media agar miring dipindah ke dalam *potato dextrose agar* (PDA) dengan cara diapus dengan usa. Selanjutnya, diinkubasikan pada suhu 30°C selama 5-7 hari. Pertumbuhan telah tampak pada hari kedua. Setelah 5 hari dipindah ke PDA lagi dengan cara diapus. Pemindahan dilakukan secara rutin 5-7 hari sekali dan baru dibiakkan pada medium pertumbuhan cair setelah dipindah ke PDA sebanyak tiga kali.

Biomassa jamur dibiakkan di dalam medium cair dengan metode digojok/digoyang dalam labu erlenmeyer menggunakan alat penggojok dengan putaran 125 kali per menit. Spora dan miselium jamur dipindah dari PDA ke dalam labu erlenmeyer volume 250 ml berisi 100 ml medium pertumbuhan. Medium pertumbuhan setiap liter tersusun dari: 20 g Bacto dektrosa, 10 g Bacto pepton, 0,2 g NaCl, 0,1g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g KCl, 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4$  dan 0,0005 g  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Sebelum diantoklaf pH medium pertumbuhan diatur ke pH 5 dengan 1N HCl. Pada saat inokulasi, labu erlenmeyer digojok dengan penggojok elektrik dengan putaran 125 rpm selama 5 hari pada suhu kamar. Pemanenan biomassa dilakukan dengan cara menyaring dengan saringan berukuran 150  $\mu\text{m}$ . Selanjutnya, biomassa dicuci dengan air murni (*deionized water*). Biomassa yang telah dicuci ini disebut biomassa hidup. Kemudian biomassa direbus dengan 250 ml 1N NaOH selama 15 menit, selanjutnya dicuci dengan air murni hingga pH larutan bekas cucian pada kisaran netral (7.0-7.2).

Setelah dicuci, biomassa dikeringkan pada oven suhu 60°C selama 12 jam dan dibuat bubuk dengan cara digiling dengan mortar. Bubuk biomassa yang diperoleh disebut *pre-treated biomass* (biomassa praperlakuan). Pada penelitian ini hanya digunakan biomassa praperlakuan sebagai absorbent untuk mengambil krom dari larutan.

#### D. Percobaan Biosorpsi Krom VI dan Krom III dengan Biomassa *A. niger*.

Larutan Cr(VI) dibuat dengan cara melarutkan 2,5 g  $K_2Cr_2O_7$  di dalam 1 liter air suling, maka diperoleh konsentrasi 1000 mg/l Cr. Larutan Cr(III) dibuat dengan cara melarutkan 3,77 g  $Cr_2(SO_4)_3$  di dalam air suling yang diasamkan dengan  $H_2SO_4$  encer untuk mencegah hidrolisis, diperoleh konsentrasi 1000 mg/l Cr; pH larutan krom diatur dengan 1N NaOH dan 1N  $H_2SO_4$ . Konsentrasi krom diukur dengan Spektrofotometer serapan atom Shimadzu AAS 6800 pada panjang gelombang 357,9 nm. Semua percobaan biosorpsi dilakukan pada tabung erlenmeyer ukuran 250 ml dan digojok dengan alat penggojok orbital pada 125 rpm pada suhu kamar. Percobaan dilakukan dua kali, nilai rerata digunakan dalam analisis data.

Konsentrasi awal 25, 50, dan 100 ppm dibuat dengan cara mengencerkan 25, 50, 75 dan 100 ml konsentrasi 1000 mg/l larutan krom sulfat (Cr III) dan larutan kalium bikromat (CrVI) menjadi 1 liter dengan air suling. 0,1 g biomassa pra-perlakuan dicampur dengan 75 ml larutan Cr(III) atau Cr(VI) di dalam 250 ml labu erlenmeyer. Sebelum dicampur dengan biomassa *Aspergillus niger*, pH larutan diatur pada pH 2.0 dengan 1N NaOH dan 1N  $H_2SO_4$ . Selanjutnya diambil 2 ml sampel untuk ditentukan kadar kromnya dengan AAS. Labu erlenmeyer digojok pada alat penggojok dengan kecepatan putaran 125 rpm selama 12 jam pada suhu kamar. Biomassa dipisahkan dari larutan dengan cara disaring dengan kertas saring selanjutnya disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Sampel untuk uji kandungan krom yang tidak diabsorpsi diambil dari supernatan. Pengujian krom dengan AAS pada panjang gelombang 357,9 nm.

### V. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Reduksi dan Biosorpsi Krom oleh *Fusarium sp.*

Jamur *Fusarium sp.* mampu mereduksi

Cr(VI) menjadi Cr(III). Ini ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan, yaitu dari warna *oranye* menjadi *ungu* (Wang & Xiao, 1995). Senyawa krom mempunyai variasi warna menurut besarnya valensi, senyawa kromat kuning, dan bikromat berwarna *oranye*, sedangkan oksida krom ( $Cr_2O_3$ ) berwarna hijau. Bikromat dalam larutan asam direduksi menjadi senyawa Cr(III) yang berwarna hijau atau *ungu*, sedangkan pada lingkungan basa ion Cr(III) berubah menjadi  $CrO_4^{2-}$  yang berwarna hijau. Mekanisme bioakumulasi logam berat belum semuanya dapat dijelaskan (Solisio *et al.*, 2000). Pada mikroorganisme, polisakarida penyusun dinding sel dapat bertindak sebagai tempat pengikatan logam berat, pada sistem yang lain logam berat mengalami presipitasi sebagai hidroksida di dalam dinding sel (Solisio *et al.*, 2000). Pada jamur, dinding selnya sebagian besar tersusun dari kitin dan kitosan, kedua bahan ini mempunyai afinitas yang tinggi dalam mengikat logam berat (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Hasil penelitian Chui *et al.* (1996) menunjukkan bahwa 95% ion Cr(III) dapat diambil dengan kitin kulit udang.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 72,03% ion krom dapat diambil dari larutan (Tabel 1.) Biosorpsi ion logam terutama terjadi oleh ikatan permukaan, termasuk reaksi tukar ion dan pengompleksan dengan gugus fungsional. Berbagai gugus fungsional diyakini ikut serta dalam pengikatan ion logam berat antara lain gugus karboksil, amina, fosfat, hidroksil dan sulfhidril (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Menurut Senthilkumaar *et al.*, (2000) beberapa biomolekul termasuk protein, polisakarida dan polimer ekstraselular yang mengandung gugus  $SO_4^{2-}$ ,  $RCOO^-$ , dan  $PO_4^-$  bertanggung jawab terhadap bioakumulasi logam berat. Selanjutnya, disebutkan bahwa pengambilan logam berat dari larutan mengikutsertakan proses-proses pengkompleksan, koordinasi, kelasi, tukar ion, adsorpsi dan mikropresipitasi. Cr adalah ion logam sekaligus anion sehingga dapat terikat secara elektrostatis pada gugus karboksil dan sulfat (Saq & Kutsal, 1996).

Bila di lingkungan hidup mikroorganisme terdapat bahan beracun seperti logam berat, maka mikroorganisme akan menanggapi dengan melakukan mekanisme pertahanan diri agar tetap hidup (Gadd, 1990). Mekanisme tersebut pada garis besarnya berupa pencegahan masuknya ion logam berat, pengeluaran kembali serta pengasingan ion logam berat yang masuk ke dalam sel (Asmara, 1996). Gadd (1990) menyatakan bahwa mekanisme detoksifikasi terhadap ion-ion logam berat dapat berupa sintesis protein khusus (*metallothionin*), atau ekstrapolimer yang dapat mengikat ion logam tersebut.

Hughes dan Poole (1989) menjelaskan teori penyisihan dan penyerapan logam berat sebagai berikut: (1) pengikatan kation logam pada permukaan sel atau di dalam sel yang melibatkan perubahan sistem transport; (2) translokasi logam berat ke dalam sel yang melibatkan sistem transport; (3) pembentukan presipitat yang mengandung logam hasil reaksi dengan polimer ekstrasel; dan (4) detoksifikasi oksidasi/reduksi enzimatis menjadi bentuk yang kurang atau tidak toksik. Menurut Manahan (1992) transpor nutrisi ke dalam sel dan keluarnya sisa metabolisme ke luar sel bakteri, diatur oleh membran sitoplasma. Tenaga penggerak untuk transpor nutrisi adalah gradien konsentrasi, transpor aktif dan translokasi gugus suatu senyawa. Masuknya krom (Cr(III) dan Cr(VI)) ke dalam sel jamur dapat melalui satu atau lebih mekanisme absorpsi tersebut. Pada biomassa jamur yang hidup, mekanisme absorpsinya dapat secara aktif maupun pasif. Setelah masuk ke dalam sel, Cr(VI) akan mengalami reduksi menjadi Cr(III) oleh enzim kromat reduktase. Bila Cr yang masuk ke dalam sel terlalu banyak, maka akan ditempatkan di dalam *vacuola* atau dikeluarkan lagi dari sel (Gadd, 1990). Jamur mampu mengakumulasi mikronutrien seperti Cu, Zn, Cr dan Mn serta logam non-nutrien dalam jumlah yang jauh melebihi kebutuhannya (Gadd, 1986 cit. Kapoor & Viraraghavan, 1995).

Pada Tabel 1 tampak adanya peningkatan penyerapan total krom dan Cr(VI) pada biomassa jamur. Pada hari ke-4 terjadi penyerapan krom total sebesar 91,124 mg/l (63,46%) dari konsentrasi awal sebesar 143,592 mg/l, Cr(VI) sebesar 62,012 mg/l (66,57%) dari konsentrasi awal sebesar 93,280 dan Cr(III) sebesar 24,112 mg/l (47,92%) dari konsentrasi awal 50,312 mg/l. Pada hari ke 8 serapan total krom menjadi 103,132 mg/l (71,82%), Cr(VI) menjadi 78,996 mg/l (84,69%) dan Cr(III) tidak berubah 24,137 mg/l (47,97%). Cr(VI) mampu masuk ke dalam sel dalam jumlah yang lebih besar dari Cr(III), karena Cr(VI) bersifat mobil dan mampu menembus membran sel. Reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) diduga terjadi, baik di dalam sel maupun di luar sel. Reduksi di luar sel dilakukan oleh enzim ekstrasel, sedangkan di dalam sel dilakukan oleh enzim-enzim reduktase intrasel. Peningkatan biosorpsi pada hari ke- 8 disebabkan oleh masih adanya pertumbuhan jamur *Fusarium sp.* sehingga sisi pengikatan pada dinding sel juga bertambah; akibatnya penyerapan juga meningkat.

Cr(III) karena molekulnya lebih besar dari Cr(VI) dan kelarutannya rendah, maka kalah bersaing dalam mendapatkan sisi pengikatan pada dinding sel. Cr(III) mobilitasnya juga lebih rendah dari-pada Cr(VI), dan akan meningkat bila ada ligan organik yang mengikat dan membawanya masuk ke dalam sel. Tingginya penyerapan ion-ion logam ke dalam sel jamur karena dinding sel jamur tersusun dari kitin dan kitosan. Kedua senyawa ini mampu mengikat ion logam krom. Jamur juga menghasilkan fitokelatin dan metalothionin yaitu peptida berberat molekul rendah dan kaya *cystein* yang mampu mengikat ion logam berat esensial maupun non-esensial termasuk krom (Gadd, 1992). Tabel 2 menunjukkan adanya peningkatan penyerapan total krom dan Cr(III) pada biomassa jamur. Pada hari ke-4 terjadi penyerapan krom total sebesar 93,196 mg/l (66,03%) dari konsentrasi awal sebesar 141,060 mg/l, Cr(VI) sebesar

75,281 mg/l (88,56%) dari konsentrasi awal sebesar 85,001 dan Cr(III) sebesar 17,915 mg/l (32,42%). Pada hari ke 8 serapan total krom menjadi 102,491 mg/l (72,66%), Cr(VI) menjadi 79,275 mg/l (93,26%) dan Cr(III) meningkat menjadi 23,216 mg/l (42,01%). Dari kedua tabel tersebut tampak adanya kemiripan pola reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) dan pola bioakumulasi krom oleh jamur *Fusarium sp.* Menurut Gadd (1992) biosorpsi logam berat oleh sel hidup dapat terjadi secara aktif maupun pasif. Biosorpsi pada permukaan dinding sel terjadi sangat cepat (10 menit pertama), sedangkan ke dalam sel tergantung pada metabolisme sel. Menurut Manahan (1992) transpor nutrisi ke dalam sel dan keluarnya sisa metabolisme ke luar sel bakteri, diatur oleh membran sitoplasma. Tenaga penggerak untuk transpor nutrisi adalah gradien konsentrasi, transport aktif dan translokasi gugus suatu senyawa. Menurut Gadd (1992), masuknya logam berat ke dalam sel secara aktif memerlukan tenaga dari ATP. Penyerapan Cr(VI) tampak lebih baik pada medium yang ditambah *sludge* limbah penyamakan kulit, tetapi efisiensi reduksi kromnya rendah, terbukti dengan rendahnya Cr(III) pada biomassa. Diduga logam Cr(VI) hanya sedikit yang tereduksi, dan Cr(VI) ini hanya disimpan di organel di dalam sel saja.

## B. Biosorpsi Logam Krom dengan Biomassa *Aspergillus niger*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi awal larutan krom meningkatkan jumlah krom yang diabsorpsi oleh biomassa *A. niger*. Pada konsentrasi awal 25 ppm hanya 48,12% Cr(III) dapat diabsorpsi oleh biomassa, tetapi pada konsentrasi 75 ppm meningkat menjadi 72,59% dan konsentrasi awal 100 ppm meningkat menjadi 96,24%. Hasil yang lebih baik dicapai oleh biomassa *A. niger* dalam mengikat Cr(VI) (Tabel 4), pada konsentrasi awal 25 ppm hanya 53,77% yang dapat diabsorpsi. Setelah ditingkatkan sampai perlakuan 2 yaitu 50 ppm, penyerapan meningkat menjadi 93,96%. Dari Tabel 3 dan 4 tampak bahwa pada konsentrasi awal 100-300 mg/l pada pH 2,0 dan menggunakan 0,1 g biomassa, penyerapan Cr(III) dapat mencapai 70-90%, sedangkan untuk Cr(VI) penyerapan pada konsentrasi awal 100-300 mg/l dapat mencapai lebih dari 90%.

Menurut Kapoor dan Viraravaghan (1995) biomassa sel mati mempunyai efisiensi biosorpsi yang lebih besar dibandingkan sel hidup karena tidak terpengaruh oleh toksisitas logam berat. Biosorpsi logam krom oleh sel mati hanya terjadi secara pasif. Logam krom berikatan pada sisi-sisi pengikatan di dinding sel biomassa, yaitu pada gugus

**Tabel 1. Kandungan Cr total, Cr(III) dan Cr(VI) Biomassa *Fusarium sp.* pada Medium Potato Dekstrosa Cair yang Diberi K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dengan Waktu Inkubasi 4 dan 8 hari**

Kandungan krom	Cairan 0 hari	Biomassa 4 hari	Biomassa 8 hari
Total Cr, mg/l	143,592	91,124 <sup>a</sup>	103,132 <sup>b</sup>
Cr(VI), mg/l	93,280	62,012 <sup>a</sup>	78,996 <sup>b</sup>
Cr(III), mg/l	50,312	24,112	24,134

Keterangan: a, b, pada baris yang sama menunjukkan ada beda nyata ( $P > 0,05$ )

**Tabel 2. Kandungan Cr total, Cr(III) dan Cr(VI) Biomassa *Fusarium sp.* pada Medium Potato Dekstrosa Cair yang Diberi Sludge Limbah Penyamakan Kulit dengan Waktu Inkubasi 4 dan 8 hari**

Kandungan krom	Cairan 0 hari	Biomassa 4 hari	Biomassa 8 hari
Total Cr, mg/l	141,060	93,196 <sup>a</sup>	102,491 <sup>b</sup>
Cr(VI), mg/l	85,001	75,281 <sup>a</sup>	79,275 <sup>b</sup>
Cr(III), mg/l	55,260	17,915 <sup>a</sup>	23,216 <sup>b</sup>

Keterangan: a, b, pada baris yang sama menunjukkan ada beda nyata ( $P>0,05$ )

fungsional seperti amina, karboksilat dan hidroksil (Gadd, 1992).

Logam Cr(VI) bersifat mobil dan aktif sehingga mampu menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel lewat pori sel. Pada penelitian ini biomassa sudah direbus dengan IN NaOH, komponen dinding sel sudah dirusak oleh basa, kitin berubah menjadi kompleks kitosan-glukan yang mempunyai afinitas lebih besar dalam pengikatan logam berat (Kapoor & Viraraghavan, 1995 dan 1998). Dibanding biomassa hidup, penyerapan logam berat jauh lebih cepat, hanya dalam waktu 12 jam hampir 100% logam Cr dapat diambil dari larutan. Perbedaan ini diduga karena adanya perbedaan

penyusun dan tingkah laku komponen dinding sel di antara spesies jamur (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Peningkatan konsentrasi meningkatkan penyerapan ion krom; ini berarti bahwa sisi pengikatan pada biomassa masih cukup menampung logam berat pada konsentrasi sampai dengan 300 mg/l.

## VI. KESIMPULAN

Biomassa *Fusarium sp.* mampu mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) berdasarkan perubahan warna dan konsentrasi Cr(VI) dan Cr(III) pada biomassa. Ada kemiripan pola serapan

**Tabel 3. Penyerapan Cr(III) oleh Biomassa *A. niger* pada Berbagai Konsentrasi Awal**

Konsentrasi awal (ppm)	Konsentrasi Cr terukur (mg/l)	Cr tak terabsorpsi (mg/l)	Cr yang diabsorpsi (mg/l)	Persentase
25	23,160	12,016	11,144	48,12
50	25,206	10,482	14,724	58,41
75	109,132	29,920	79,212	72,58
100	382,068	14,376	367,692	96,24

**Tabel 4. Penyerapan Cr(VI) oleh Biomassa *A. niger* pada Berbagai Konsentrasi Awal**

Konsentrasi awal (ppm)	Konsentrasi Cr terukur (mg/l)	Cr tak terabsorpsi (mg/l)	Cr yang diabsorpsi (mg/l)	Persentase
25	40,778	18,851	21,927	53,77
50	123,065	7,431	115,634	93,96
75	223,235	10,861	212,374	95,13
100	296,227	11,053	285,174	96,27

biomassa *Fusarium sp.* pada medium yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  atau yang mengandung *sludge* limbah penyamakan kulit, 73 % ion logam krom dapat diambil dari larutan. Hampir 90% Cr(VI) yang terdapat pada medium/larutan dapat diambil oleh biomassa *Fusarium sp.* Biomassa *Aspergillus niger* dapat digunakan untuk mengambil logam Cr(III) dan Cr(VI) dari larutan. Pada pH 2,0, berat biomassa 0,1 g dan konsentrasi awal 100-300 mg/l logam Cr(III) 70-90% dapat diambil dari larutan, sedangkan untuk Cr(VI) lebih dari 90% dapat diambil dari larutan. Terdapat perbedaan kecepatan penyerapan di antara spesies jamur, juga antara sel hidup dan mati. Biomassa jamur *Fusarium sp.* hidup dan *Aspergillus niger* mati dapat digunakan sebagai bioremediator dalam penanganan limbah cair penyamakan kulit secara biologi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1976. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 14<sup>th</sup> ed., APHA, Washington.
- Asmara, W. 1996. Bioakumulasi Metal Berat pada Mikroorganisme dan Aspek Genetik Biosorpsi dan Bioakumulasi Logam Berat. Lokakarya Bioakumulasi Metal. Yogyakarta September 1996. PAU Bioteknologi UGM dan International Institut Bioteknologi.
- Balamurugan, K., C. Vasant, R. Rajaram, & T. Ramasami. 1999. Hydroxypentaammine chromium(III) Promoted Phosphorylation of Bovine Serum Albumin: Its Potential Implications in Understanding Biototoxicity of Chromium. *Bioch. et Bioph. Acta* 1427: 357-366.
- Chui, V.W.D., K. W. Mok, C.J. Ng, B. P. Luong, & K.K. Ma. 1996. Removal and recovery of Copper(II), Chromium(III), and Nickel(II) from Solutions Using Crude Shrimp Chitin Packed in Small Columns. *Env. Int.* 22(4): 463-468.
- Gadd, G. M. 1990. "Biosorption. Chemistry and Industry". dalam *Encyclopedia of Microbiology*. Vol 2 : 351-360. Academic Press, Inc..
- , 1992. "Heavy Metal Pollutants: Environmental and Biotechnological Aspects". dalam *Encyclopedia of Microbiology*, Volume 2. Academic Press. Inc.
- Grubinger, V. P., W. H. Gutenmann, G. J. Doss., M. Rutzke & D. J. Lisk. 1994. Chromium in Swiss Chard grown in Soil Amended with tannery meal fertilizer. *Chemosphere*. 28: 717.
- Huges, M. N. & R. K. Poole. 1989. *Metals and Microorganism*. Chapman and Hall. London.
- Kapoor, A & T. Viraraghavan. 1995. Fungal biosorption-An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review. *Bioresource Technology*. 53: 195-206.
- Kapoor, A. & T. Viraraghavan. 1998. Biosorption of Heavy Metals on *A. niger*: Effect of Pretreatment. *Bioresource Technology*. 63: 109-113.
- Kapoor, A., T. Viraraghavan D. Roycullimare. 2000. Removal of Heavy Metal Using the Fungus *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 70: 95-104.
- Losi, M.E. and W.T. Frankenberger, Jr. 1983. Chromium-resistant Microorganism Isolated from Evaporation Ponds a Metal processing Plant. *Water, Air and Soil Pollution*. 74: 405-413.
- Macchi, G., M. Pagano, M. Pettine, M. Santori, & G. Tiravanti. 1991. A Bench Study on Chromium Recovery from Tannery Sludge. 1991. *Water Res.* 1019-1026.
- Manahan, S.E. 1992. *Toxicological Chemistry*. 2<sup>nd</sup>. Lewis Publ. Tokyo.
- Ning, J. & M.H. Grant. 1999. Chromium (VI)-induced Cytotoxicity to Osteoblast derived Cell. *Toxicology in Vitro*. 13: 879-887.

- Rutland, F.H. 1991. Environmental Compatibility of Chromium-Containing Tannery and Other Leather Product Waste at Land Disposal Site. *JALCA*. 86: 365-375.
- Senthilkumar, S. S. Bharathi, D. Nithyanandhi, & V. Subburam. 2000. Biosorption of toxic heavy metals from aqueous solutions. *Bioresource Technology*. 75. 163-165.
- Solisio, C. A. Lodi, A. Converti & M. Delborghi. 2000. The effect of acid pretreatment on the biosorption of chromium(III) by *Sphaerotillus natans* from industrial wastewater. *Water Res.* 12: 3174-3178.
- Wang, Y.T. & C. Xiao. 1995. Factors Affecting Hexavalent Chromium Reduction In Pure Cultures of Bacteria. *Water Res.* 11: 2467-2474.
- Triatmojo, S. 1999. Penyerapan logam krom pada tanaman caisin (*Brassica chinensis* L) yang diberi kromosal dan *sludge* limbah penyamakan kulit. *Buletin Peternakan*. Edisi tambahan: 227-223.
- Triatmojo, S. 2000. Kandungan krom kacang tanah yang dipupuk kompos yang mengandung kromosal. *Buletin Peternakan*. 24: 118-125.
- Winter, D. 1985. Techno-economic Study on Measures to Mitigate the Environmental impact of Leather Industry, Particulary in Developing Countries. UNIDO. Innsburck.
- Sag, Y., & T. Kutzal. 1996a. The Selective Biosorption of Chromium (VI) and Copper (II) Ions from Binary Metal Mixtures by *R. Arrhizuz*. *Process Biochemistry*. 31: 561-572.
- Sag, Y., & T. Kutzal. 1996b. Fully Competitive Biosorption of Chromium (VI) and Iron (III) Ion from Binary Metal Mixtures by *R. arrhizus*: Use of the Competitive Langmuir Model. *Process Biochemistry*. 31(6): 573-585.
- Sag, Y., U. A. Z. Aksu and T. Kutsal. 1998. A comparative study the simultaneous biosorption of Cr (VI) and Fe(III) on *C. vulgaris* and *R. arrhizus*: application of the competetive adsorption models. *Process Biochemistry*. 33: 273-281
- Sag, Y., & T. Kutzal. 2000. Determination of Biosorption Activation of Biosorption Activation Energy of Heavy Metal Ions on *Zooglea ramigera* and *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*. 35. 801-807.