

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI DIAZINON DARI TANAH SAWAH DI KABUPATEN BREBES

Jebria Kwartaning Tyas, Agung Suprihadi, dan Budi Raharjo

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, *Tembalang, Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690*

Abstrak

Upaya intensifikasi pertanian seringkali menghadapi kendala dengan keberadaan organisme pengganggu tanaman (OPT) yang menyebabkan penurunan hasil panen bahkan gagal panen. Pengendalian OPT dengan menggunakan pestisida telah dianggap oleh petani sebagai salah satu cara yang mampu menyelamatkan hasil pertanian dari serangan OPT. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan isolat dan karakter bakteri yang dapat mendegradasi diazinon. Sumber mikroba diambil dari sampel tanah di daerah Kabupaten Brebes, yaitu Kecamatan Ketanggungan, Kecamatan Wanasari, Kecamatan Losari, dan Kecamatan Larangan. Penelitian dilakukan dengan isolasi dan skrining untuk mendapatkan isolat, kemudian dilanjutkan dengan karakterisasi isolat meliputi pengamatan morfologi bakteri dan uji biokimia. Isolat yang didapatkan selanjutnya dilakukan uji resistensi untuk mengetahui kemampuan bakteri bertahan terhadap diazinon, kemudian dilakukan pengukuran kurva pertumbuhan dan yang langkah akhir adalah dilakukan uji degradasi diazinon dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Medium yang digunakan untuk isolasi dan skrining adalah Mineral Salt Medium (MSM) yang ditambahkan dengan diazinon 0,5 ppm, hasil akhir diperoleh 6 isolat, yaitu JKB1, JKB2, JKB3, JKB4, JKB5, dan JKB6. Uji resistensi dilakukan pada konsentrasi 20-90 ppm sebagai batas ambang resistensi keenam isolat. Isolat yang paling resisten adalah JKB3 yang ditunjukkan dengan jumlah sel terbanyak dibanding dengan isolat lain. Kurva pertumbuhan dibuat dengan menginokulasikan isolat pada medium MSM + diazinon 90 ppm, diperoleh isolat JKB5 yang mempunyai kemampuan adaptif yang tertinggi. Uji degradasi diazinon dideteksi dengan KCKT dengan variasi waktu inkubasi selama 24, 48, dan 72 jam. Isolat JKB2 dan JKB1 yang mempunyai daya degradasi lebih tinggi dibandingkan dengan keempat isolat lainnya, karena terjadi penurunan konsentrasi diazinon pada JKB2 sebesar 76,27 ppm atau 84,74% dan diikuti JKB1 sebesar 70,05 ppm atau 77,83%.

Kata kunci : Diazinon, Isolat, Karakterisasi, Resistensi, Degradasi

Abstract

An intensification in agriculture often faces some threats due to the existence of plant interrupted organism which often causes the decreasing of the harvest or even the failure of the harvest. The growth controlling of the Plant Interrupted Organism by using pesticide by most of the farmers has been considered as a solution that can save or protect the harvest from the attack of the Plant Interrupted Organism. The objective of this research is to get isolate and bacterial characteristic which able to degrade the diazinon. The main source of the microbes are taken from the soil sample in Brebes Regency, especially in Ketanggungan District, Wanasari District, Losari District, dan Larangan District. The research was conducted by isolation and screening for isolates followed by a

characterization of bacterial isolates include morphological observations and biochemical tests. Isolates that have acquired resistance test of diazinon is then performed to determine the extent of the ability of bacteria to survive, and then to measure the growth curve and the final step is to test the degradation of diazinon by using HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The medium which were used in isolation and screening process were Mineral Salt Medium (MSM) that had been added with diazinon 0,5 ppm and the final results obtained six isolates, there were JKB1, JKB2, JKB3, JKB4, JKB5 and JKB6. The result of resistance test showed that concentration of 90 ppm was the resistance limit of the six isolates, and the most resistance isolate was JKB3 which was shown with the greatest amount of the cells than other isolates. The growth curve was made by inoculating the isolates on MSM medium with 90 ppm diazinon, then it would get JKB5 isolate which has the highest adaptive ability. Diazinon degradation test was detected with HPLC in some varieties of incubation time, like 24, 24, and 72 hours. From this test we could get the JKB2 isolate and JKB1 isolate which had higher degradation ability than four isolates, due to a decrease in the concentration of diazinon on JKB2 at 76.27 ppm or 84.74%, followed by JKB1 70,05 ppm or 77.83%.

Keywords : Diazinon, Isolate, Characterization, Resistance, Degradation

Pendahuluan

Intensifikasi pertanian merupakan kebijakan yang diambil pemerintah sebagai upaya untuk memenuhi kebutuhan akan pangan di Indonesia sejalan dengan laju pertumbuhan jumlah penduduk yang semakin meningkat. Upaya intensifikasi pertanian seringkali menghadapi kendala dengan keberadaan organisme pengganggu tanaman (OPT) yang seringkali menyebabkan penurunan hasil panen atau bahkan gagal panen.

Intensifikasi pertanian telah diterapkan dengan beberapa teknologi untuk meningkatkan hasil panen yang optimal, salah satunya adalah dengan penggunaan agrokimia (bahan kimia sintetik) (Priyanto, 2009). Pengendalian OPT dengan menggunakan pestisida telah dianggap oleh petani sebagai salah satu cara yang mampu menyelamatkan hasil pertanian dari serangan OPT. Hal ini menyebabkan pestisida menjadi sarana yang memegang peranan penting dan

dibutuhkan oleh petani (Budigunawan, 2004).

Pemakaian pestisida oleh petani di Brebes umumnya sangat intensif baik dosis maupun frekuensinya, sehingga mempengaruhi kualitas lahan dan ekosistem sekitarnya. Pestisida yang banyak digunakan oleh petani di daerah Brebes adalah pestisida organofosfat jenis diazinon dengan frekuensi aplikasi 5-30 kali per musim tanam (\pm 60 hari) (Budigunawan, 2004). Penggunaan pestisida dengan konsentrasi tinggi dan dalam jangka waktu yang panjang akan menjadikan kualitas lahan pertanian mengalami penurunan yang menjadi penyebab menurunnya kualitas dan kuantitas produksi. Pestisida organofosfat dikenal sebagai pestisida yang sangat toksik, namun pada umumnya cepat terurai di lingkungan dan tidak menyebabkan bioakumulatif (Djojosemarto, 2008).

Pestisida organofosfat dapat diuraikan ke permukaan tanah melalui beberapa proses, yaitu volatilisasi, fotolisis, hidrolisis, dan biodegradasi.

Biodegradasi dapat terjadi dengan kondisi aerobik dan anaerobik. Hidrolisis merupakan mekanisme yang penting untuk proses degradasi, terutama dengan kadar pH rendah baik di dalam tanah (Cycoń *et al.*, 2009).

Degradasi oleh mikroba diharapkan dapat menentukan nasib diazinon di lingkungan. Banyak penulis telah mengindikasikan bahwa *strain* bakteri dari kelompok taksonomi yang berbeda mempunyai kemampuan yang baik dalam mendegradasi pestisida. Kajian degradasi secara mikrobial sangat bermanfaat bagi pengembangan strategi bioremediasi untuk meracuni OPT dengan memanfaatkan mikroorganisme (Cycoń *et al.*, 2009).

Mengingat persawahan di daerah Brebes sering menggunakan diazinon, maka perlu diteliti keberadaan bakteri pendegradasi diazinon pada areal tersebut. Sifat-sifat bakteri di lingkungan tersebut yang telah diteliti diharapkan berpotensi mendegradasi pestisida organofosfat serta dapat digunakan sebagai agen bioremediasi tanah yang tercemar oleh pestisida

Bahan dan Metode

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah sampel tanah sawah yang diambil dari 4 kecamatan di Brebes, yaitu Kecamatan Wanasari, Kecamatan Larangan, Kecamatan Ketanggungan dan Kecamatan Losari. Selain itu, bahan yang diperlukan adalah pestisida diazinon 600 g L^{-1} .

Medium yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Mineral Salt Medium* (MSM) dengan pH 7,2 dan

komposisinya dalam 300 mL adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,06 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0003 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,45 g, KH_2PO_4 0,45 g. Medium MSM diperkaya dibuat dengan penambahan pepton 0,9 g dan yeast extract 0,06 g. Medium yang juga digunakan untuk isolasi bakteri adalah medium *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB). Bahan untuk uji biokimia medium SIM (*Sulfide Indole Motility*) dan reagen Kovac's untuk uji Indole, Medium MR-VP untuk uji *Methyl Red* dan *Voges-Proskauer*. Reagen yang digunakan untuk uji *methyl red* adalah *methyl red* dan *voges - proskauer* adalah reagen Barrit's A dan B. Medium Simmon Sitrat agar digunakan untuk uji Simmon Sitrat, Urease Broth untuk uji urease, H_2O_2 3 % untuk uji katalase, dan medium nutrien gelatin untuk uji gelatin. Pengecatan gram menggunakan gram A, B, C dan D. Medium *Triple Sugar-Iron Agar* digunakan untuk uji TSIA

Metode

a. Pengambilan dan Persiapan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari empat lokasi kecamatan yang berbeda di daerah Brebes, yaitu Kecamatan Wanasari, Kecamatan Larangan, Kecamatan Ketanggungan, dan Kecamatan Losari. Pengambilan sampel tanah sawah dilakukan dengan sistem diagonal (Ardiwinata, 2007).

Tanah diambil dengan cara digali dengan menggunakan sekop pada kedalaman 0 - 20 cm, selanjutnya dilakukan pencampuran dari 5 titik lokasi pengambilan tanah dalam satu kecamatan. Pengambilan sampel tanah tersebut sudah dilakukan oleh salah satu peneliti di BPPT Serpong.

Sampel tanah sebanyak 500 g yang sudah diambil kemudian disimpan di dalam *cold room* (ruang dingin dengan suhu $\pm 7-10^{\circ}\text{C}$).

b. Isolasi Bakteri

Sampel dari masing-masing kecamatan ditimbang seberat 1 g dengan menggunakan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL aquades steril secara aseptis di dalam LAF. Tabung reaksi yang sudah diisi oleh sampel tanah ditutup dengan menggunakan sumbat, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* dan suspensi tanah diambil secara aseptis sebanyak 5 mL dengan menggunakan mikropipet.

Masing-masing suspensi tanah dimasukkan secara aseptis ke dalam 45 mL medium MSM diperkaya di dalam labu erlenmeyer dan diinkubasi dengan menggunakan *rotary shaker* pada kecepatan 120 rpm serta suhu 37°C dan rentang waktu inkubasinya adalah 24, 48, dan 72 jam.

Suspensi tanah diperkaya yang sudah diinkubasi, pada masing-masing rentang waktunya serta dilakukan pengenceran berseri 10^{-1} sampai 10^{-7} . Hasil pengenceran 10^{-7} diambil sebanyak 1 mL dan dilakukan pencawanan dengan medium MSM agar diperkaya sebagai kontrol dan 1 mL dicawankan pada medium MSM agar + diazinon 0,5 ppm. Suspensi tanah yang dicawankan diinokulasikan dengan metode agar sebar (*spread plate*) yang diratakan dengan menggunakan batang *spreader* kemudian diinkubasikan di dalam inkubator pada suhu 37°C .

Dilakukan pengamatan pertumbuhan dan morfologi koloni-

koloni yang tersebar di permukaan agar sebagai kultur campuran, antara lain pengamatan terhadap bentuk, elevasi, warna dan ukuran. Kultur campuran yang tumbuh pada medium kontrol bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman (biodiversitas) bakteri yang berasal dari masing-masing sampel tanah. Kultur yang mampu tumbuh pada medium MSM + Diazinon 0,5 ppm merupakan salah satu upaya skrining yang bertujuan untuk menapis bakteri yang mampu tumbuh pada medium yang miskin nutrisi dan mengandung diazinon.

Dilakukan pemisahan kultur campuran dari medium MSM + Diazinon 0,5 ppm untuk mendapatkan kultur murni dengan cara mengambil satu sengkeli koloni yang berdiameter paling besar dengan menggunakan ose tumpul dan dilakukan kultivasi kembali dengan teknik isolasi menggunakan metode cawan gores pada medium NA dan dilakukan pengamatan makroskopis antara lain pengamatan ukuran, warna, bentuk, tepi dan elevasi. Koloni yang terpisah pada cawan gores dipindahkan secara aseptik pada media agar NA miring yang digunakan sebagai kultur stok dan dilakukan pengamatan terhadap bentuk, ukuran, warna, dan karakteristik optikal.

c. Karakterisasi Isolat Bakteri

Karakterisasi isolat bakteri dilakukan terhadap beberapa isolat bakteri yang telah melalui proses penapisan/skrining yang berpotensi dalam mendegradasi pestisida organofosfat jenis diazinon. Karakterisasi ini dilakukan dengan melakukan pengamatan morfologi sel dengan pengecatan gram serta uji biokimia yang bertujuan untuk mengetahui sifat fisiologis dan

aktivitas gerak dari isolat bakteri. Karakterisasi dan Uji biokimia yang dilakukan antara lain pewarnaan gram uji katalase, uji fermentasi karbohidrat dan pembentukan H₂S, uji hidrolisis gelatin, uji urease, uji indol, uji methyl red, uji Voges-Proskauer, uji sitrat, dan uji motilitas.

d. Uji Resistensi Bakteri terhadap Diazinon

Isolat bakteri yang telah diperoleh dari medium MSM + diazinon 0,5 ppm dilakukan uji resistensi terhadap diazinon. Isolat tersebut diambil sebanyak satu sengkeli dengan menggunakan ose tumpul secara aseptis. Sengkeli dari isolat tersebut diinokulasikan secara aseptis ke dalam medium NB yang telah ditambahkan dengan diazinon dengan variasi konsentrasi 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm dan 90 ppm, kemudian diinkubasi dengan *rotary shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37 °C. Pengamatan kemampuan resistensi bakteri terhadap diazinon dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Konsentrasi diazinon yang diperoleh dari uji resistensi adalah pada konsentrasi 90 ppm dan dibuat kurva resistensi.

e. Uji Degradasi Diazinon dan Pengukuran Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pengukuran kurva pertumbuhan dibuat dengan menggunakan isolat yang resisten terhadap diazinon. Isolat tersebut diambil sebanyak satu sengkeli dengan menggunakan ose tumpul secara aseptik dan diinokulasikan ke dalam medium MSM + diazinon 90 ppm. Isolat diinkubasikan dengan *rotary shaker* berkecepatan 120 rpm pada suhu 37°

C dengan rentang waktu 24, 48, dan 72 jam. Kurva pertumbuhan dibuat dengan mengambil suspensi sebanyak 0,2 mL dari isolat dan dilakukan pada saat jam ke 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24.

Penghitungan jumlah sel dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Penghitungan jumlah sel dilakukan menggunakan *counter* dengan rumus jumlah sel/mL = Jumlah sel x 2,5.10⁵. Uji degradasi isolat bakteri terhadap diazinon dilakukan menggunakan KCKT, namun dilakukan preparasi sampel terlebih dahulu. Preparasi sampel dilakukan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil natan dan supernatan dan diletakkan pada tempat yang terpisah lalu disimpan di dalam kulkas dengan suhu 4°C. Langkah berikutnya adalah dilakukan analisa sampel dengan menggunakan KCKT. Kolom yang digunakan adalah kolom C18, eluennya adalah acetonitril : air (70:30) dengan panjang gelombang 254 nm dan waktu retensi 15 menit.

Hasil dan Pembahasan

Isolat Bakteri Pendegradasi Diazinon

Jumlah isolat yang diperoleh dari hasil isolasi dan karakterisasi serta pengamatan morfologi sampel tanah dari empat kecamatan di Kabupaten Brebes dengan menggunakan medium kontrol adalah sebanyak 26 isolat, dengan perincian jumlah isolat yang diperoleh dari Kecamatan Wanasari, Kecamatan Losari, dan Kecamatan Larangan, masing-masing berjumlah 6 isolat, sedangkan dari Kecamatan Ketanggungan diperoleh 8 isolat.

Isolat yang tumbuh pada medium kontrol menandakan biodiversitas bakteri yang terdapat di dalam masing-masing sampel tanah. Medium kontrol merupakan medium yang kaya akan nutrisi sehingga memungkinkan semua jenis bakteri dapat tumbuh karena kebutuhan akan nutrisi terpenuhi. Nutrisi-nutrisi tersebut berasal dari *yeast extract*, pepton dan glukosa, yang berfungsi sebagai sumber karbon dan protein, sehingga pertumbuhan sel terjadi lebih cepat daripada medium yang miskin akan nutrisi.

Hasil isolasi dan penapisan bakteri dengan menggunakan medium

miskin nutrisi, yaitu medium MSM yang ditambahkan dengan diazinon 0,5 ppm diperoleh sebanyak 13 isolat bakteri yang mampu tumbuh dan bertahan hidup, hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu memanfaatkan unsur karbon dan fosfat yang terdapat di dalam diazinon untuk membentuk struktur sel dan asam nukleat berupa DNA dan RNA yang bermanfaat dalam sintesis protein.

Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri yang tumbuh pada medium MSM + diazinon 0,5 ppm dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri pada Medium MSM + Diazinon 0,5 Ppm

No.	Kode Isolat	Ciri Morfologi Koloni			
		Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
1	JBK1	White	Circular	Entire	Flat
2	JBK2	Pink	Irregular	Undulate	Flat
3	JBK3	Transparent	Circular	Entire	Raised
4	JBK4	Transparent	Circular	Entire	Flat
5	JBLos1	Pink	Irregular	Serrate	Flat
6	JBLos2	White- Yellowish	Irregular	Undulate	Flat
7	JBLos3	Transparent	Circular	Entire	Flat
8	JBW1	Transparent	Circular	Entire	Raised
9	JBW2	Transparent	Irregular	Undulate	Flat
10	JBW3	White	Circular	Entire	Flat
11	JBLa1	Pink	Circular	Entire	Flat
12	JBLa2	White	Circular	Entire	Flat
13	JBLa3	White	Irregular	Serrate	Flat

Keterangan : JBK : Brebes Ketanggungan, JBLos : Brebes Losari, JBW : Brebes Wanasari, JBLa : Brebes Larangan

Isolat-isolat tersebut dikultivasi pada medium NA yang merupakan medium yang kaya akan nutrisi, sehingga masing-masing isolat tersebut mampu menunjukkan morfologi yang sesungguhnya. Hasil kultivasi pada medium NA

menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut pada akhirnya mampu tumbuh berdasarkan morfologi yang sesungguhnya, dan pada akhirnya, dari 13 isolat diperoleh 6 isolat yang mempunyai bentuk yang berbeda. Keenam isolat tersebut diberi nama

JKB1, JKB2, JKB3, JKB4, JKB5, dan JKB6. Isolat yang termasuk ke dalam JKB1 meliputi JBLos2, JKB1, JKB2, dan JBLos1. Isolat yang termasuk ke dalam JKB2 antara lain adalah JBLos3, JBW1, JBLa1, JBW3, dan JBLa3, sedangkan isolat JKB3 merupakan JKB3, JKB4 merupakan JKB4, JBLa2 merupakan JKB5, dan Isolat JBW2

merupakan JKB6. Keenam isolat tersebut kemudian dilakukan pengamatan morfologi koloni secara makroskopis meliputi warna, bentuk, tepi dan elevasi dari koloni yang terpisah. Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri pada agar cawan tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri pada Agar Cawan dengan Medium NA

No	Kode Isolat	Ciri Morfologi Koloni			
		Warna	Bentuk	Tepi	elevasi
1	JKB1	White	Irregular	Undulate	Raised
2	JKB2	White -Yellowish	Irregular	Undulate	Raised
3	JKB3	White-Yellowish	Irregular	Undulate	Flat
4	JKB4	White- Yellowish	Irregular	Undulate	Flat
5	JKB5	White-Yellowish	Irregular	Lobate	Flat
6	JKB6	White-Yellowish	Irregular	Lobate	Flat

Hasil pengamatan di atas menunjukkan bahwa keenam isolat tersebut mampu tumbuh dengan baik dibandingkan ketika isolat tersebut tumbuh di medium MSM + diazinon 0,5 ppm. Bentuk keenam isolat adalah *irregular* dengan bagian tepi yang nampak sebagian besar adalah *undulate* atau bergelombang dan juga *lobate* atau berlekuk dan berelevasi datar (*flat*) serta pada umumnya berwarna putih kekuningan (*white-*

yellowish) kecuali pada JKB1 yang berwarna putih (*white*).

Pembuatan kultur stok dilakukan dengan mengkultivasi isolat pada agar miring yang juga dilakukan pengamatan secara makroskopis, hasil pengamatan makroskopis dari goresan tunggal di atas permukaan agar miring dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengamatan makroskopis Koloni Bakteri pada Agar Miring dengan Medium NA

No.	Kode Isolat	Ciri Morfologi Koloni		
		Bentuk	Karakteristik Optikal	Warna
1	JKB1	Filiform	Translucent	White
2	JKB2	Filiform	Translucent	White
3	JKB3	Echinulate	Translucent	White
4	JKB4	Filiform	Translucent	White
5	JKB5	Arborescent	Translucent	White
6	JKB6	Filiform	Translucent	White

Pengamatan pada agar miring menunjukkan bahwa keenam bakteri tersebut tidak mempunyai pigmen berwarna sehingga hanya menghasilkan warna koloni yang berwarna putih. Karakteristik optikal yang diamati berkaitan dengan pertumbuhan koloni, keenam isolat tersebut bersifat *translucent* atau sebagian tembus pandang. JKB1, JKB2, JKB4, dan JKB6 mempunyai bentuk *filiform* yang bersinambung

seperti benang dengan tepi licin, sedangkan JKB4 berbentuk *echinulate* yang bersinambung seperti benang dengan tepi tidak rata, dan JKB5 berbentuk *arborescent* seperti bentuk pohon dengan percabangan. Keenam isolat tersebut juga diidentifikasi berdasarkan karakteristik secara biokimia dan pengecatan gram yang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Karakterisasi dan Uji Biokimia Isolat Bakteri dari Medium MSM + Diazinon 0,5 ppm

No	Isolat Uji Biokimia	JKB 1	JKB 2	JKB 3	JKB 4	JKB 5	JKB 6
1	Pewarnaan Gram	-	-	-	-	-	-
2	Katalase	+	+	+	+	+	+
3	Indol	-	-	-	-	-	-
4	Methyl Red	+	+	+	-	+	-
5	Voges Proskauer	-	-	-	-	+	+
6	Sitrat	-	-	+	+	+	+
7	Urease	-	-	-	-	-	-
8	Hidrolisis Gelatin	+	+	+	+	+	+
9	Motilitas	+	+	+	+	+	+
10	*) Fermentasi Karbohidrat dan Pembentukan H ₂ S	3	3	1	1	2'	3

Keterangan :

*) Fermentasi Karbohidrat dan Pembentukan H₂S : 1. Bagian agar miring alkalin (merah) dan bagian bawah asam (kuning) tanpa gas, 1'. Bagian agar miring alkalin (merah) dan bagian bawah asam (kuning) dengan gas, 2. Bagian agar miring asam (kuning) dan bagian bawah kuning tanpa produksi gas, 2'. Bagian agar miring asam (kuning) dan bagian bawah kuning dengan produksi gas, 3. Bagian agar miring merah juga bagian bawah atau tidak ada perubahan pada bagian bawah (jingga-merah).

Hasil uji biokimia pada Tabel 4. menunjukkan bahwa keenam isolat bakteri merupakan jenis bakteri gram negatif. Sel yang dimiliki oleh keenam isolat tersebut hanya memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis dan diliputi oleh lapisan membran luar yang tersusun dari lipid. Membran luar yang tersusun dari lipid terlarut ketika diberikan gram C, karena gram C

merupakan alkohol yang berfungsi untuk melarutkan lemak pada membran luar sehingga ikatan kompleks yang telah tersusun dari gram A dan gram B (ikatan CV-I) akan segera tersingkir pada dinding tipis dan tidak banyak yang berikatan silang. Alkohol tersebut (gram C) akan melepaskan ikatan CV-I sehingga sel menjadi tidak berwarna, sehingga

ketika diberikan gram D sel yang telah mengalami pemucatan akan menjadi merah.

Uji Katalase pada Tabel 4 menunjukkan hasil positif, hal ini berarti bahwa keenam isolat mampu menghasilkan enzim katalase dalam mendegradasi hidrogen peroksida yang merupakan senyawa beracun yang menyebabkan kematian bakteri apabila tidak segera didegradasi. Uji indol menunjukkan hasil negatif hal ini menunjukkan bahwa keenam isolat tidak mampu mendegradasi asam amino triptofan yang berasal dari SIM agar. Asam amino triptofan merupakan asam amino esensial yang dapat dioksidasi oleh aktivitas enzimatik bakteri seperti enzim triptofanase, keberadaan indol dideteksi dengan reagen Kovac's yang menghasilkan warna merah ungu.

Uji Methyl Red pada JKB1, JKB2, JKB3 dan JKB5 menunjukkan hasil positif, hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu mengoksidasi glukosa dari medium MR-VP yang dimanfaatkan untuk memproduksi energi dan menghasilkan produk akhir berupa asam yang diindikasikan dengan indikator merah metil. JKB4 dan JKB6 menunjukkan hasil negatif, hal ini dimungkinkan produk akhir yang dihasilkan masih terdapat kandungan asam, namun konsentrasi hidrogennya rendah sehingga menghasilkan warna kuning.

Uji Voges-Proskauer menunjukkan hanya JKB5 dan JKB6 yang mempunyai hasil positif, hal ini berarti kedua isolat mempunyai kemampuan untuk menghasilkan substansi non asam dengan produk akhir netral sebagai hasil dari metabolisme glukosa setelah direaksikan dengan reagen Barrit's.

JKB1, JKB2, JKB3, dan JKB4 menunjukkan hasil negatif yang menandakan isolat tersebut tidak mampu menghasilkan substansi non asam.

Uji sitrat yang dilakukan bertujuan untuk membedakan isolat bakteri yang mampu memfermentasikan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya. Hasil positif diperoleh pada JKB3, JKB4, JKB5, dan JKB6, hal ini menunjukkan keempat isolat ini mampu memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi biru. Sitrat merupakan intermediet utama dalam Siklus Krebs yang diproduksi melalui kondensasi asetil aktif dengan asam oksaloasetat, dengan enzim sitrase dihasilkan oksaloasetat dan asam asetat yang secara enzimatik menjadi asam piruvat dan CO₂. Selama reaksi berlangsung, medium berubah menjadi basa dan CO₂ bereaksi dengan natrium dan air membentuk Na-karbonat, sehingga akan mengubah warna biru bromtimol dari hijau menjadi biru gelap. Hasil negatif ditunjukkan dengan warna media yang tetap hijau, nampak pada JKB1 dan JKB2.

Hasil dari uji urease pada penelitian ini menunjukkan semua isolat tidak dapat mendegradasi urea dengan enzim urease, hal ini disebabkan karena enzim urease yang merupakan biokatalisator organik tidak mampu dihasilkan oleh masing-masing isolat, sehingga bakteri tidak dapat memisahkan ikatan nitrogen dan karbon pada urea dan tidak dapat membentuk produk akhir berupa amonia yang bersifat basa.

Uji hidrolisis gelatin menunjukkan bahwa keenam isolat

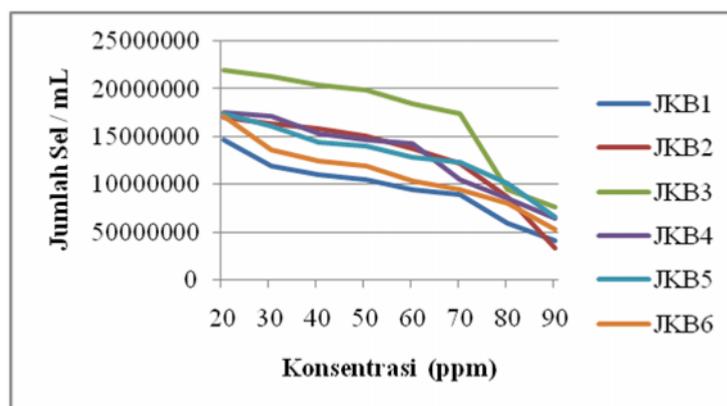
menghasilkan hasil positif, yang ditandai dengan kultur yang masih tetap cair ketika diinkubasi ke dalam kulkas bersuhu 4°C. Hal ini mengindikasikan bahwa keenam isolat bakteri tersebut mampu mencairkan gelatin dengan enzim ekstraseluler proteolitik, yaitu gelatinase yang mampu menghidrolisis protein menjadi asam amino sehingga gelatin akan tetap cair meskipun berada pada suhu 4°C. Uji motilitas menunjukkan hasil positif karena menghasilkan kekeruhan seperti kabut.

Uji fermentasi karbohidrat dan pembentukan H₂S pada JKB1, JKB2, dan JKB6 menunjukkan bagian agar miring berwarna merah juga bagian bawah atau tidak ada perubahan pada bagian bawah (jingga merah), hal ini berarti tidak terjadi fermentasi karbohidrat, hanya terjadi katabolisme pepton sehingga menghasilkan reaksi alkalin (merah) akibat adanya produksi amonia. JKB3 dan JKB4 menunjukkan hasil reaksi pada bagian agar miring berwarna merah (alkalin) dan bagian bawah berwarna kuning (asam) tanpa produksi gas, hal ini menandakan adanya fermentasi glukosa dan konsentrasi asam yang dihasilkan sangat kecil sehingga

segera dioksidasi. Pepton yang terkandung di dalam media dimanfaatkan oleh bakteri sehingga menghasilkan alkalin. Bagian bawah asam karena adanya tekanan oksigen yang rendah dan pertumbuhan bakteri yang melambat. JKB5 menunjukkan hasil reaksi pada bagian agar miring asam (kuning) dan bagian bawah juga berwarna kuning (asam) dengan produksi gas. Hal ini menunjukkan adanya fermentasi laktosa dan atau sukrosa karena kedua substansi ini berkonsentrasi tinggi, sehingga fermentasi terus berlangsung dan menghasilkan asam baik pada agar miring maupun bagian bawah

Uji Resistensi Bakteri Terhadap Diazinon

Uji resistensi bakteri dilakukan dengan menggunakan medium NB (*Nutrient Broth*) yang ditambahkan dengan diazinon. Tujuan penggunaan medium NB yang telah ditambahkan dengan diazinon adalah untuk mengetahui ketahanan hidup isolat bakteri pada medium dengan nutrisi lengkap, dengan beberapa variasi konsentrasi diazinon yang dimulai dari konsentrasi 20 ppm sampai dengan 90 ppm



Gambar 1. Grafik Resistensi Isolat Bakteri Terhadap Diazinon

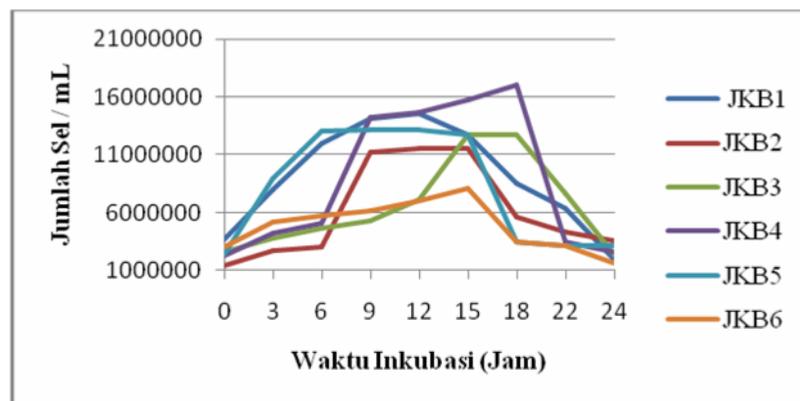
Gambar 1. merupakan hasil dari uji resistensi yang dilakukan dengan inkubasi selama 24 jam. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi diazinon menyebabkan terjadinya penurunan jumlah sel, sehingga semakin tinggi konsentrasi diazinon yang diberikan ke dalam medium, maka penurunan jumlah sel yang terjadi semakin besar. Keenam isolat bakteri tersebut mempunyai kemampuan untuk resisten pada konsentrasi 90 ppm, oleh karena itu konsentrasi tersebut digunakan untuk melakukan uji degradasi diazinon.

Isolat bakteri yang memiliki jumlah sel terbanyak adalah JKB3, berdasarkan penghitungan dengan menggunakan *haemacytometer* diperoleh jumlah populasi sel sebanyak $7,6 \times 10^7$ (76.166.666 sel), populasi ini merupakan jumlah tertinggi dibandingkan dengan 5 isolat lainnya. Populasi terendah terdapat pada JKB1 dengan jumlah $2,4 \times 10^7$

(24.416.666 sel). Perbedaan jumlah sel ini disebabkan karena pada saat masing-masing isolat mempunyai efektivitas metabolisme yang berbeda-beda.

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan secara teratur semua komponen di dalam sel hidup, meliputi peningkatan jumlah komponen-komponen sel termasuk DNA sehingga ukuran sel juga bertambah besar. Bakteri adalah sel prokariotik yang tumbuh dengan cara pembelahan biner, dimana satu sel akan membelah secara simetris menjadi dua sel. Isolat bakteri yang resisten terhadap diazinon merupakan jenis bakteri gram negatif, sehingga pembentukan dinding sel terjadi secara berselang-seling di seluruh dinding sel. Pengukuran kurva pertumbuhan dilakukan dengan menggunakan medium MSM dengan diazinon 90 ppm.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Pendegradasi Diazinon

Pengukuran kurva pertumbuhan dilakukan dengan melakukan penghitungan jumlah sel pada jam ke

0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, dan 24. Kurva pertumbuhan di atas menunjukkan bahwa keenam isolat

bakteri mampu tumbuh hanya dengan memanfaatkan sumber karbon dan

fosfat dari diazinon serta mikronutrien yang berasal dari medium MSM.

Tabel 5. Unsur-Unsur Penyusun Medium MSM

No.	Komposisi	Massa (g L ⁻¹)
1	(NH ₄) ₂ SO ₄	2
2	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
3	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,01
4	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,001
5	Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	1,5
6	KH ₂ PO ₄	1,5
7	Diazinon	90 ppm

Sumber karbon dimanfaatkan oleh isolat bakteri untuk pembentukan struktur sel dan energi, sedangkan fosfat dimanfaatkan oleh bakteri untuk pembentukan asam nukleat, fosfolipid, dan koenzim. Sumber mikronutrien anorganik berasal dari bahan-bahan penyusun MSM antara lain Mg, Ca²⁺, Fe²⁺, dan Na, yang berfungsi untuk regulasi osmosis serta aktivitas enzim, dan transpor elektron.

Kurva pertumbuhan pada gambar 2. menunjukkan bahwa setiap isolat mempunyai fase pertumbuhan yang berbeda-beda, hal ini disebabkan karena adanya perbedaan efektivitas metabolisme pada masing-masing isolat. Isolat JKB1 dan JKB6 mempunyai jumlah sel yang cukup tinggi dan isolat JKB2 mempunyai jumlah sel yang terendah pada jam ke-0. Isolat JKB4 dan JKB 5 memiliki jumlah sel yang sama, yaitu $2,3 \times 10^6$ sel, sedangkan jumlah sel yang dimiliki oleh isolat JKB3 adalah $2,3 \times 10^6$ pada jam ke-0. Jumlah sel bakteri pada jam ke-0 menunjukkan fase lag yang berlangsung segera setelah dilakukan inokulasi dan merupakan waktu adaptasi bagi bakteri.

Isolat dengan kemampuan adaptasi yang tercepat adalah JKB5, sedangkan JKB2 mempunyai

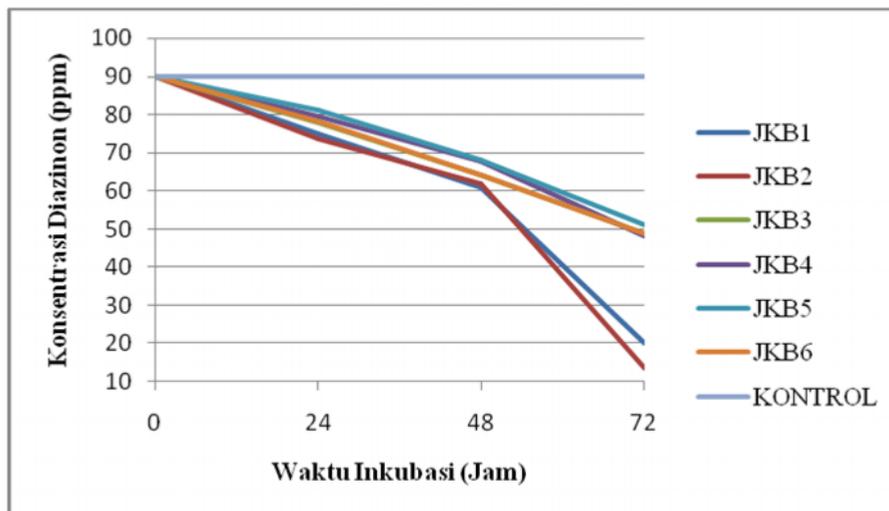
kemampuan adaptasi yang paling lambat, hal ini ditunjukkan pada jumlah sel pada jam ke-3, cepat atau lambatnya fase ini berlangsung sangat dipengaruhi oleh keberadaan substrat, jumlah sel, usia sel, keadaan inokulum dan kondisi lingkungan, hal ini mempengaruhi perkembangan fase-fase berikutnya. Faktor lain penyebab fase adaptasi berjalan lambat adalah karena kultur dipindahkan dari medium yang kaya nutrien (NA) ke medium yang kandungan nutriennya terbatas (MSM). Isolat JKB1 memasuki fase eksponensial pada jam ke-12 kemudian dilanjutkan dengan fase penurunan jumlah sel pada jam-jam berikutnya, dan pada jam ke-24 diperoleh jumlah sel akhir sebanyak $2,0 \times 10^6$. Isolat JKB2 memasuki fase eksponensial pada jam ke-6 sampai jam ke-12, dan memasuki fase stasioner diantara jam ke-12 sampai jam ke-15, kemudian diikuti dengan fase penurunan yang dimulai dari jam ke-15 sampai jam ke-24. Jumlah sel akhir pada jam ke-24 adalah $3,6 \times 10^6$, yang berjumlah lebih banyak dibandingkan dengan fase awal.

Isolat JKB3 memasuki fase eksponensial pada jam ke-3 sampai dengan jam ke-15. Fase stasioner terjadi antara jam ke-15 sampai

dengan jam ke-18 dengan jumlah sel $1,3 \times 10^7$, kemudian dilanjutkan dengan fase penurunan sampai dengan jam ke-24 dengan jumlah sel akhir adalah $2,4 \times 10^6$. Isolat JKB4 memulai fase eksponensial pada jam ke-3 sampai jam ke-18 dan langsung mengalami fase penurunan yang dimulai ketika memasuki jam ke -21 sampai jam ke-24. Isolat JKB5 memasuki fase eksponensial pada jam ke-3 sampai jam ke-6, kemudian mengalami penurunan jumlah sel dan memasuki dengan fase stasioner pada jam ke-9 sampai jam ke-15 dengan jumlah sel $1,3 \times 10^7$, lalu pada jam ke-18 mengalami penurunan jumlah sel sampai jam ke-24, dengan jumlah sel akhir $3,1 \times 10^6$. Isolat JKB6 menunjukkan fase eksponensial pada jam ke-3 sampai jam ke-15, kemudian terjadi penurunan jumlah sel tanpaterbentuk fase stasioner pada jam ke-18 sampai jam ke-24 dengan jumlah sel akhir adalah $1,7 \times 10^6$.

Uji Degradasi Diazinon dengan KCKT

Degradasi merupakan suatu bentuk perubahan, baik susunan maupun perombakan senyawa dan menghasilkan senyawa yang lebih stabil dari senyawa semula (Atlas & Bartha, 1992). Hasil uji degradasi diazinon dinyatakan dalam bentuk kromatogram dari kromatogram tersebut diperoleh data berupa angka yang kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan melakukan penghitungan faktor kapasitas, faktor separasi, resolusi, ketinggian puncak, dan faktor respon. Berdasarkan hasil penghitungan, maka diperoleh isolat JKB2 dan JKB1 yang efektif dalam mendegradasi diazinon sebanyak 84,74 % dan 77, 83 % sedangkan isolat lainnya mendegradasi diazinon antara 43 - 46 % . Gambar 4.3. di bawah ini menunjukkan kurva hasil degradasi diazinon.



Gambar 3. Kurva Hasil Degradasi Isolat Bakteri dengan KCKT

Berdasarkan kurva pertumbuhan dan kurva degradasi diazinon, maka dapat dilihat bahwa degradasi diazinon masih tetap berlangsung hingga waktu ke 72 jam, meskipun pada waktu ke 24 jam sudah mengalami penurunan jumlah sel, hal ini dapat terjadi karena proses degradasi senyawa anorganik dapat terjadi tidak hanya faktor biotik yang melibatkan mikroorganisme, namun juga dipengaruhi oleh faktor abiotik, antara lain temperatur $\pm 25^{\circ}\text{C}$, kelembaban, dan pH kisaran 5,5 – 8,5 (Leland, 1998). Faktor lain yang mempengaruhi keberlangsungan degradasi diazinon adalah proses lisis ketika sel bakteri akan memasuki fase kematian, maka sel pecah serta mengeluarkan komponen-komponennya berupa karbon dan akan dimanfaatkan untuk kehidupan sel berikutnya. Faktor biotik dan abiotik berjalan secara simultan dalam proses degradasi diazinon, selain itu enzim yang dihasilkan oleh bakteri juga dapat menyebabkan terjadinya degradasi.

Kesimpulan

Hasil isolasi dan penapisan bakteri dengan menggunakan medium miskin nutrien, yaitu medium MSM yang ditambahkan dengan diazinon dengan konsentrasi 0,5 ppm diperoleh enam isolat yaitu JKB1, JKB2, JKB3, JKB4, JKB5, dan JKB6. Keenam isolat tersebut mampu menunjukkan resistensinya pada konsentrasi diazinon 90 ppm dalam medium MSM yang mampu mendegradasi diazinon. Isolat yang paling resisten terhadap diazinon adalah JKB3. Semakin lama waktu inkubasi maka konsentrasi diazinon semakin berkurang. Isolat

JKB2 dan JKB1 yang mempunyai daya degradasi terhadap diazinon lebih tinggi dibandingkan dengan keempat isolat lainnya

Daftar Pustaka

- Ardiwinata, A.S. 2007. Petunjuk Teknis Analisis Residu Pestisida. Balai Penelitian Lingkungan Pertanian, Pati.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. 1992. Microbial Ecology, Fundamental and Application Third Edition. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc, California. Dalam Dongowea, H.E. dan David, A. 1996. Biodegradasi Pestisida Organofosfat oleh *Pseudomonas* sp. *Biota*. 1(2): 29-33.
- Budigunawan, A.N. 2004. Analisis Residu Klorpirifos pada Tanah Aluvial Setelah Penanaman Bawang Merah di Brebes. *Skripsi*. Program Studi Ilmu Tanah S-1 Departemen Tanah Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Cycoń, M., Marcin, W., and Zofia P.S. 2009. Biodegradation of the Organophosphorus Insecticide Diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and Their Use in Bioremediation of Contaminated Soil. *Chemosphere*, 79 (2009) 494-501.
- Djojosumarto, P. 2008. Pestisida dan Aplikasinya. Agromedia Pustaka, Jakarta..
- Leland, J.E. 1998. Evaluating the Hazard if Land Applying Composted Diazinon Waste Using Earthworm Biomonitoring. *Thesis*. Faculty of The Virginia

Polytechnic Institute and State
University, Virginia.
Prijanto, T.B. 2009. Analisis Faktor
Risiko Keracunan Pestisida
Organofosfat pada Keluarga

Petani Hortikultura di Kecamatan
Ngablak Kabupaten Magelang.
Tesis. Program Pascasarjana
Universitas Diponegoro,
Semarang.