



TESIS - SK 142502

**PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI TERHADAP
BIODEGRADASI DDT OLEH
*Gloeophyllum trabeum***

AULIA ULFI
NRP 1414 201 032

DOSEN PEMBIMBING
Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D

PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN BIOKIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016



THESES - SK 142502

**EFFECT OF ADDITION OF BACTERIA IN
BIODEGRADATION OF DDT BY
*Gloeophyllum trabeum***

AULIA ULFI
NRP 1414 201 032

SUPERVISOR
Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D

MAGISTER PROGRAM
EXPERTISE FIELD OF BIOCHEMISTRY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016

Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :
AULIA ULFI
NRP. 1414 201 032

Tanggal Ujian : 25 JULI 2016
Periode Wisuda : SEPTEMBER 2016

Disetujui oleh :


1. **Adi Setyo Purnomo, M.Sc, Ph.D**
NIP. 19806724 200812 1 002

(Pembimbing)

2. **Prof. Dr. Taslim Ersam, M.S**
NIP. 19520816 197903 1 004

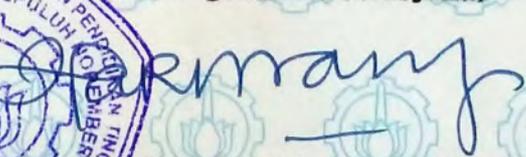
(Penguji)


3. **Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si**
NIP. 19740428 199802 1 001

(Penguji)

Direktur Program Pascasarjana,




Prof. Dr. Djauhar Manfaat, M.Sc, Ph.D

NIP. 19601202 198701 1 001

PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI TERHADAP BIODEGRADASI DDT OLEH *Gloeophyllum trabeum*

Nama : Aulia Ulfi
NRP : 1414 201 032
Jurusan : Kimia ITS
Pembimbing : Adi Setyo Purnomo, M.Sc, Ph.D

ABSTRAK

DDT (1,1,1-trikloro-2,2 bis (4-klorofenil) etana) merupakan insektisida sintesis yang memiliki beberapa efek negatif bagi lingkungan dan manusia. Oleh karena itu, sangat penting untuk menentukan metode yang efektif untuk degradasi. Jamur pelapuk coklat, *Gloeophyllum trabeum* mempunyai kemampuan untuk mendegradasi DDT, namun kemampuannya membutuhkan waktu yang sangat lama. Pada penelitian ini, pengaruh penambahan *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Ralstonia pickettii* (screening bakteri), variasi jumlah penambahan bakteri 1, 3, 5, 7 dan 10 mL dan variasi waktu penambahan bakteri pada hari ke 0, 1, 3, dan 5 terhadap degradasi DDT oleh *G. trabeum* telah diuji. *R. pickettii* dapat meningkatkan proses degradasi, dimana penambahan *R. pickettii* 10 mL pada hari ke-1 menunjukkan biodegradasi DDT paling tinggi yaitu 92.41% selama 7 hari inkubasi. DDD terdeteksi sebagai metabolit produk melalui reaksi deklorinasi.

Kata kunci: Biodegradasi, DDT, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia pickettii*, *Gloeophyllum trabeum*.

EFFECT OF ADDITION OF BACTERIA ON BIODEGRADATION OF DDT BY *Gloeophyllum trabeum*

Name : Aulia Ulfi
NRP : 1414 201 032
Department : Chemistry ITS
Supervisor : Adi Setyo Purnomo, M.Sc, Ph.D

ABSTRACT

DDT (1,1,1-trichloro-2,2 bis (4-chlorophenyl) ethane) is a synthetic insecticide which has several negative effects to the environment and human. Therefore, determining an effective method to reduce DDT may give beneficial impact. Brown-rot fungus, *Gloeophyllum trabeum*, is well known to have an ability to degrade DDT, despite the fact that it might require a long-term remediation. In this study, the effect of addition of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Ralstonia pickettii* (screening of bacteria), the volume of bacteria at 1, 3, 5, and 10 mL and biodegradation the time range of addition of bacteria on days 0, 1, 3, and 5 on biodegradation of DDT by *G. trabeum* had been investigated. *R. pickettii* enhanced the degradation process, in which the addition of 10 ml of this bacteria at day 1 possessed a highest value of 92.41% within 7 days incubation. DDD was detected to be a product metabolite through dechlorination reaction.

Keywords: Biodegradation, DDT, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia pickettii*, *Gloeophyllum trabeum*

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii

BAB I PENDAHULUAN

1.1	Latar Belakang.....	1
1.2	Perumusan Masalah.....	3
1.2	Batasan Masalah.....	4
1.3	Tujuan Penelitian.....	4
1.4	Manfaat Penelitian.....	4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1	Pestisida.....	5
2.2	DDT.....	6
2.3	Biodegradasi.....	10
2.4	Jamur Pelapuk Coklat.....	12
2.5	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	14
2.6	Reaksi Fenton.....	16
2.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.8	<i>Bacillus subtilis</i>	19
2.9	<i>Ralstonia pickettii</i>	20
2.10	Biosurfaktan.....	21

2.11	Jalur Degradasi DDT oleh BRF dan Bakteri.....	23
2.12	Spektrofotometer UV-Vis.....	25
2.13	HPLC.....	26
2.14	GC-MS.....	28

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1	Alat dan Bahan.....	31
3.1.1	Alat.....	31
3.1.2	Bahan.....	31
3.2	Prosedur Kerja.....	32
3.2.1	Regenerasi Jamur <i>Gloeophyllum trabeum</i>	32
3.2.2	Regenerasi Bakteri.....	32
3.2.3	Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	32
3.2.4	Pembuatan Kurva Standar DDT.....	32
3.2.5	Pengaruh Bakteri pada Pertumbuhan <i>G. trabeum</i>	33
3.2.6	Biodegradasi DDT oleh <i>Gloeophyllum trabeum</i>	33
3.2.7	Pengaruh Jenis Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i> (Screening Bakteri).....	34
3.2.8	Pengaruh Jumlah Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i> (Variasi Jumlah Bakteri).....	34
3.2.9	Pengaruh Waktu Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i> (Variasi Waktu Penambahan Bakteri).....	35
3.2.10	Perolehan Ulang (Recovery) DDT dan Identifikasi Metabolit Produk.....	35
3.2.11	Penentuan Jalur Degradasi.....	36

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Regeneration Jamur <i>Gloeophyllum trabeum</i>	37
4.2	Regenerasi Bakteri.....	38
4.3	Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	39
4.4	Pembuatan Kurva Standar DDT.....	41
4.5	Pengaruh bakteri pada pertumbuhan <i>G. trabeum</i>	42

4.6	Biodegradasi DDT oleh <i>Gloeophyllum trabeum</i>	43
4.7	Pengaruh Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Screening Bakteri).....	50
4.8	Pengaruh Jumlah penambahan <i>R. pickettii</i> terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Variasi Jumlah Bakteri).....	52
4.9	Pengaruh Waktu Penambahan <i>R. pickettii</i> terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Variasi Waktu Penambahan Bakteri).....	53
4.10	Penentuan Jalur Degradasi.....	55

BAB V Kesimpulan dan Saran

5.1	Kesimpulan.....	57
5.2	Saran.....	57

DAFTAR PUSTAKA	59
-----------------------------	----

LAMPIRAN	69
-----------------------	----

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Metabolit produk degradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	23
Tabel 4.1	Data kurva standar DDT	41

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Sintesis DDT (Solomons, 2011)	7
Gambar 2.2	Produksi dan penggunaan DDT pada tahun 1944-1970 di Amerika Serikat (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009)	8
Gambar 2.3	Struktur DDT (Solomons, 2011)	9
Gambar 2.4	Jalur yang diusulkan dari reduksi Fe ³⁺ dan produksi H ₂ O ₂ oleh <i>G. trabeum</i> (Kerem, 1999)	15
Gambar 2.5	Mekanisme reaksi Fenton oleh BRF dalam degradasi kayu (Arantes, dkk., 2012)	17
Gambar 2.6	Mekanisme penyerangan radikal hidroksil dari reaksi Fenton (Purnomo, dkk., 2008)	18
Gambar 2.7	Struktur berbeda rhamnolipid yang dihasilkan oleh <i>P. aeruginosa</i> (Mulligan, 2004)	21
Gambar 2.8	Struktur surfaktin <i>B. subtilis</i> (Mulligan, 2005)	22
Gambar 2.9	Jalur degradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i> (Purnomo, dkk., 2008)	23
Gambar 2.10	Jalur degradasi DDT oleh <i>P. ostreatus</i> dengan penambahan <i>P. aeruginosa</i> (Ashari, 2014)	24
Gambar 2.11	Jalur metabolisme DDT oleh bakteri melalui deklorinasi reduktif yang diusulkan (Aislabie, 1997)	25
Gambar 2.12	Skema diagram spektrofotometer berkas tunggal (Harvey, 2000)	26
Gambar 2.13	Diagram blok instrumen HPLC (Lindsay, 1992)	27
Gambar 2.14	Skema diagram kromatografi gas (Harris, 2007)	28
Gambar 2.15	Skema diagram spektroskopi massa (Harris, 2007)	29
Gambar 3.1	Sketsa peletakan jamur dan bakteri (Kamei dkk., 2012)	33
Gambar 4.1	<i>G. trabeum</i>	38
Gambar 4.2	Kultur bakteri a) <i>B. subtilis</i> , b) <i>P. aeruginosa</i> , dan c) <i>R. pickettii</i>	38
Gambar 4.3	Kurva pertumbuhan <i>R. pickettii</i>	39
Gambar 4.4	Kurva pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i>	40
Gambar 4.5	Kurva pertumbuhan <i>B. subtilis</i>	40
Gambar 4.6	Kurva standart DDT	42

Gambar 4.7	Miselium jamur setelah 10 hari masa inkubasi. a) Kontrol (<i>G. trabeum</i> tanpa penambahan bakteri), b) <i>G. trabeum</i> dengan <i>B. subtilis</i> , c) <i>G. trabeum</i> dengan <i>P. aeruginosa</i> , d) <i>G. trabeum</i> dengan <i>R. pickettii</i>	42
Gambar 4.8	Kromatogram GC biodegradation DDT oleh <i>G. trabeum</i> selama 7 hari	46
Gambar 4.9	Spektra MS piren database	47
Gambar 4.10	Spektra MS piren biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	47
Gambar 4.11	Spektra MS DDT database	48
Gambar 4.12	Spektra MS DDT biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	48
Gambar 4.13	Spektra MS DDD database	49
Gambar 4.14	Spektra MS DDD biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	49
Gambar 4.15	Pengaruh penambahan bakteri volume 5 mL terhadap biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	50
Gambar 4.16	Pengaruh variasi jumlah penambahan <i>R. pickettii</i> terhadap biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	52
Gambar 4.17	Pengaruh waktu penambahan <i>R. pickettii</i> terhadap biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	54
Gambar 4.18	Kromatogram GC campuran <i>G. trabeum</i> dan <i>R. pickettii</i>	55
Gambar 4.19	Jalur Degradasi DDT campuran <i>G. trabeum</i> dan <i>R. pickettii</i>	56

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
LAMPIRAN A : SKEMA KERJA	
Skema kerja	69
LAMPIRAN B : PERHITUNGAN	
Pembuatan larutan DDT 5 mM dalam 50 ml DMSO	70
Pembuatan larutan piren 5 mM dalam 50 ml DMSO	70
Contoh Perhitungan Persen <i>Recovery</i>	70
LAMPIRAN C : DATA ANALISIS SAMPEL	
Data analisis sampel <i>G. trabeum</i>	71
Data analisis sampel dengan penambahan <i>R. pickettii</i> 1 ml	71
Data analisis sampel dengan penambahan <i>R. pickettii</i> 3 ml	71
Data analisis sampel dengan penambahan <i>R. pickettii</i> 5 ml	71
Data analisis sampel dengan penambahan <i>R. pickettii</i> 7 ml	71
Data analisis sampel dengan penambahan <i>R. pickettii</i> 10 ml	71
Data analisis sampel variasi penambahan <i>R. pickettii</i> 1 ml	72
Data analisis sampel variasi penambahan <i>R. pickettii</i> 3 ml	72
Data analisis sampel variasi penambahan <i>R. pickettii</i> 5 ml	72
Data analisis sampel variasi penambahan <i>R. pickettii</i> 7 ml	72
Data analisis sampel variasi penambahan <i>R. pickettii</i> 10 ml	72
Data analisis sampel dengan penambahan <i>P. aeruginosa</i> 5 ml	72
Data analisis sampel dengan penambahan <i>B. subtilis</i> 5 ml	73
Data analisis sampel variasi waktu penambahan <i>R. pickettii</i> hari Ke-1	73
Data analisis sampel variasi waktu penambahan <i>R. pickettii</i> hari Ke-3	73
Data analisis sampel variasi waktu penambahan <i>R. pickettii</i> hari Ke-5	73

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pestisida organoklorin merupakan pestisida sintetis yang sangat efektif untuk melawan berbagai macam serangga. Salah satunya adalah senyawa 1,1,1-trikloro-2,2-bis(4-klorofenil) etana atau dikloro difenil trikloro etana (DDT). DDT adalah insektisida sintesis pertama yang digunakan secara luas pada tahun 1940-an. DDT pertama kali disintesis oleh ahli kimia Othmar Zeidler pada tahun 1874 tetapi belum ditemukan kegunaannya. Pada tahun 1939, seorang ahli kimia Swiss Paul Hermann Muller menemukan bahwa DDT dapat digunakan sebagai insektisida. Selama perang dunia II, DDT digunakan untuk membunuh serangga pembawa penyakit malaria dan tipus. Antara tahun 1940-1970 produksi dan penggunaan DDT dari tahun ke tahun semakin meningkat, puncak maksimum produksi pada tahun 1963 kira-kira mencapai 600.000 ton dan pada tahun 1959 pengguna DDT mencapai 1,35 milyar manusia (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009).

Karena sifat DDT yang tahan lama dan beracun, pada tahun 1972 Amerika Serikat mulai melarang penggunaan DDT dan Badan perlindungan lingkungan Amerika Serikat mengklasifikasikan DDT, DDD dan DDE (DDTs) sebagai polutan (Yang dkk., 2008). Meskipun penggunaannya telah dilarang, beberapa negara berkembang masih menggunakan DDT bidang kesehatan dan pertanian (Foght dkk., 2001 dan Porto dkk., 2011). DDT sangat hidrofobik dan hampir tidak larut dalam air. Waktu paruh senyawa ini dalam air adalah 30-60 hari tetapi dapat bertahan 2-15 tahun jika berada di dalam organisme hidup (Bonde dan Toft, 2011). Paparan langsung DDT dengan jumlah yang rendah mengakibatkan gejala-gejala seperti sakit kepala, mual, muntah, kebingungan, dan tremor. DDT dan hasil metaboliknya terkumpul dalam sumber makanan dan jaringan adipose pada organisme yang terakumulasi dalam tubuh yang mengakibatkan beberapa masalah diantaranya penipisan kulit telur, menyerang sistem jaringan pusat, merusak DNA dalam sel darah, rusaknya sistem endokrin burung dan mamalia, menurunnya

kemampuan reproduksi laki-laki, mengganggu sintesis dan metabolisme hormon endogen, gangguan hormon sek, meningkatkan produksi tumor, kanker pankreas dan kanker payudara (Ahmad dkk., 2010; Purnomo dkk., 2010; Purnomo dkk., 2011). Oleh karena itu perlu dikembangkan metode remediasi untuk membersihkan limbah sisa DDT sehingga aman bagi lingkungan.

Remediasi DDT dapat dilakukan secara fisika dan kimia akan tetapi memerlukan biaya yang lebih mahal dan merusak lingkungan sehingga perlu adanya remediasi secara biologis yang aman dengan biaya murah yaitu menggunakan metode biodegradasi. Biodegradasi adalah salah satu proses bioremediasi atau menurunkan tingkat kontaminan menjadi senyawa sederhana yang kurang atau tidak beracun dalam tanah, air, dan lingkungan dengan menggunakan mikroorganisme (jamur atau bakteri) sebagai agen pendegradasi. Mikroorganisme diketahui mempunyai kemampuan dalam mengubah atau mendegradasi senyawa xenobiotik (Porto dkk., 2011). Juhasz dan Naidu (1999) melaporkan bahwa mikroorganisme dapat mendegradasi kontaminan seperti hidrokarbon dan minyak tanah, polisiklik aromatik hidrokarbon (PAHs), pentaklorofenol (PCP), poliklorinated bifenil (PCBs) dan pestisida.

Jamur merupakan mikroorganisme yang kuat dan lebih toleran terhadap polutan kimia pada konsentrasi tinggi (Gadd, 2001). Salah satu jamur yang mampu mendegradasi polutan organik adalah jamur pelapuk coklat. Jamur pelapuk coklat atau *Brown rot fungi* (BRF) merupakan jamur yang menggunakan radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi Fenton dalam mendegradasi selulosa dan hemiselulosa dengan memodifikasi lignin yang ada di sekitarnya (Niemenmaa, 2008). Selain menghasilkan radikal hidroksil, jamur ini menghasilkan enzim selulase yang digunakan untuk mendegradasi selulosa sebagai sumber karbon dan energi. Beberapa jamur pelapuk coklat yang telah digunakan untuk degradasi polutan organik antara lain: *Gloeophyllum trabeum*, *Daedalea dickinsii*, dan *Fomitopsis pinicola*. Jamur *G. trabeum* merupakan jamur pelapuk coklat yang menggunakan Fenton dalam mekanisme degradasinya. Pada tahun 2008 Purnomo dkk., melaporkan bahwa jamur *G. trabeum* mampu mendegradasi 87% DDT

selama 28 hari dalam kultur murni. Hasil ini masih relatif lama sehingga perlu dilakukan modifikasi dalam proses degradasinya (Purnomo dkk., 2008).

Salah satu metode untuk mengoptimalkan degradasi DDT oleh jamur adalah dengan penambahan bakteri. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa penggunaan kultur campuran jamur dan bakteri dapat meningkatkan kemampuan degradasi. Bakteri mampu hidup pada berbagai habitat dan mampu menguraikan senyawa-senyawa kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana untuk memperoleh zat-zat tertentu yang dibutuhkan dalam rangka mempertahankan hidupnya (Hatmanti, 2000). Plaza dkk. (2006) melaporkan bahwa *R. pickettii* dapat mendegradasi senyawa BTEX (benzen, etilbenzen, toluena, dan isomer xilen). Hai dkk. (2012) melaporkan bahwa campuran kultur *Corilous versicolor* dan bakteri dapat menghilangkan aldikarb, altrazin dan alaklorform sebesar 47, 98, dan 62% dalam kultur cair selama 14 hari. Ashari (2014) melaporkan bahwa penambahan *P. aeruginosa* pada biodegradasi DDT oleh *Pleurotus ostreatus* menghasilkan prosentase degradasi sebesar 85,74 selama 7 hari.

Berdasarkan beberapa uraian di atas, pengaruh penambahan bakteri terhadap kemampuan degradasi DDT oleh *G. trabeum* telah diuji. Bakteri yang akan digunakan adalah *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Ralstonia pickettii*. Peningkatan jumlah degradasi terjadi karena adanya sinergitas antara jamur dan bakteri. Selain dapat mendegradasi senyawa polutan, bakteri-bakteri tersebut juga dapat memproduksi biosurfaktan (Plaza dkk., 2007). Biosurfaktan merupakan senyawa aktif permukaan yang mampu menurunkan tegangan permukaan atau tegangan antar muka dua fasa. Dengan adanya biosurfaktan yang dihasilkan bakteri, kadar DDT yang terlarut meningkat sehingga jamur *G. trabeum* menjadi lebih mudah dalam mendegradasi DDT.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat ditentukan rumusan masalah pada penelitian yaitu *G. trabeum* mampu degradasi 87% DDT dalam 28 hari, hasil ini masih relatif lama. Oleh karena itu perlu di optimasi dengan penambahan bakteri

yang juga mempunyai kemampuan dalam mendegradasi DDT atau senyawa organik polutan yang lain, sehingga diharapkan dengan adanya penambahan bakteri *B. subtilis*, *P. aeruginosa* dan *R. pickettii* dapat meningkatkan jumlah degradasi dengan waktu yang singkat.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini antara lain:

1. Jenis bakteri yang dipergunakan *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii*
2. Variasi jumlah penambahan bakteri pada 1, 3, 5, 7 dan 10 mL pada 10 mL kultur *G. trabeum*.
3. Variasi waktu penambahan bakteri pada kultur *G. trabeum* pada waktu bersamaan (0 hari), 1 hari, 3 hari dan 5 hari.
4. Variabel yang diamati adalah jumlah DDT yang terdegradasi dan metabolit produk yang dihasilkan

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui pengaruh penambahan bakteri pada biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*.
2. Mengetahui metabolit yang dihasilkan.
3. Mengetahui sinergitas antara *G. trabeum* dan bakteri.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya pada bidang biodegradasi DDT dengan menggunakan bakteri dan jamur, serta untuk dikembangkan lebih lanjut pada proses aplikasi pada residu DDT.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pestisida

Pestisida adalah semua zat kimia dan bahan lain serta jasad renik dan virus yang digunakan untuk memberantas atau mencegah hama-hama dan penyakit-penyakit yang merusak tanaman, bagian-bagian tanaman atau hasil-hasil pertanian sesuai dengan Peraturan Pemerintah No. 7 tahun 1973 (Deptan, 2011). Berdasarkan organisme sasaran, pestisida dapat diklasifikasi menjadi beberapa bagian antara lain: Insektisida, fungisida, herbisida, molluskisida, rodentisida, akarisisida dan nematisida. Selain itu pestisida diklasifikasikan berdasarkan struktur kimianya antara lain: organofosfat, karbamat, organoklorin, piretrum, fenol, morpholines, kloroalkiltiol, organometalik, azoles, senyawa biperidilium, urea, anilines, dan kloronitrit (Marss dkk., 2004).

Pestisida banyak dimanfaatkan untuk pengendalian organisme pengganggu dikarenakan dapat diaplikasikan dengan mudah, setiap waktu dan setiap tempat, area yang luas, mudah diperoleh dan hasilnya dapat dirasakan dalam waktu singkat (Deptan, 2011). Jumlah pestisida yang beredar di Indonesia dari tahun ke tahun semakin meningkat, hal ini dikarenakan kira-kira 30% produksi pertanian akan hilang atau menurun yang disebabkan oleh hama. Oleh karena itu penggunaan pestisida sangat diperlukan dalam bidang pertanian (Porto dkk., 2011). Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian No. 45/Permentan/SR. 140/10/2009 menyatakan bahwa “Pestisida yang terdaftar/diinjinkan adalah pestisida yang telah memenuhi persyaratan administrasi dan kriteria teknis yang ditetapkan Menteri Pertanian”. Pestisida yang dilarang adalah pestisida yang berdasarkan klasifikasi WHO mempunyai klasifikasi sangat berbahaya sekali atau berbahaya sekali mempunyai *lethal concentration* sebesar $LC_{50} < 0.05$ mg/L dalam 4 jam paparan dan mempunyai indikasi karsinogenik, onkogenik, teratogenik dan mutagenik. Daftar bahan aktif pestisida yang dilarang di Indonesia diantaranya: Aldrin, Dieldrin, Klorodan, Heptaklor, DDT, Endrin,

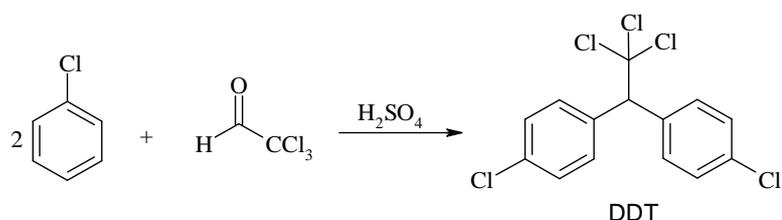
Heksakloro Siklo Heksan, dan Mireks (Ashari, 2014 ; Deptan, 2011). Pestisida diaplikasikan pada permukaan tanah sehingga dapat dengan mudah berpindah dan bergerak ke bawah sampai ke dalam permukaan air, bahkan dapat mencapai lingkungan perairan yang secara signifikan jaraknya lebih jauh. Oleh karena itu, pestisida dapat mengkontaminasi daerah lain yang jaraknya jauh dari tempat dimana pestisida itu digunakan.

Pestisida organoklorin merupakan pestisida sintetis yang sangat efektif untuk melawan berbagai macam serangga, yang termasuk pestisida organoklorin antara lain; Aldrin, Dieldrin, Klorodan, Heptaklor, DDT, Endrin, Heksakloro Siklo Heksan, dan Mireks (Ashari, 2014; Deptan, 2011; Porto dkk., 2011). Organoklorin dapat terkumpul dalam organisme dan menyebabkan efek kronis pada kesehatan seperti kanker, neurologi dan teratogenik karena sifatnya yang sangat beracun dan karsinogenetik sehingga sangat susah dan resisten terhadap biodegradasi selama beberapa tahun (Porto dkk., 2011).

2.2 DDT

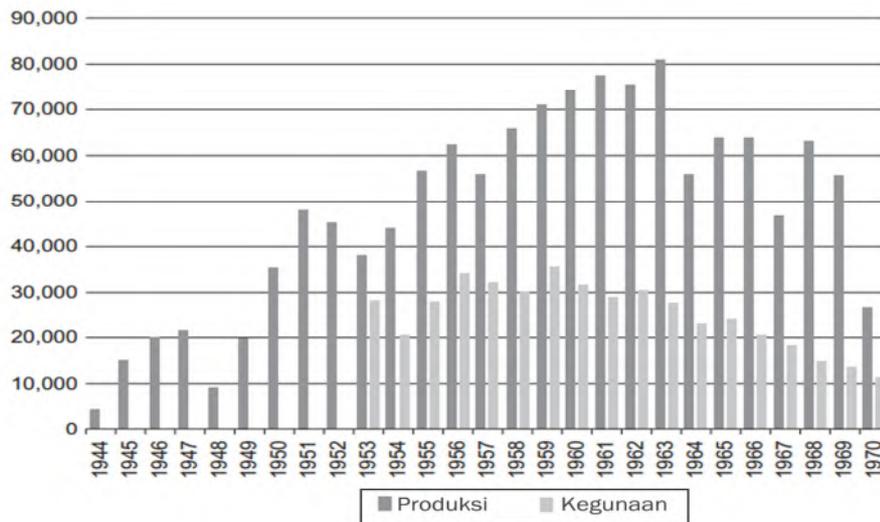
Senyawa 1,1,1-Trikloro-2,2-bis (4-klorofenil) etana atau dikloro difenil trikloroetana (DDT) adalah insektisida sintesis pertama yang digunakan secara luas. DDT pertama kali disintesis oleh ahli kimia Othmar Zeidler pada tahun 1874 tetapi belum ditemukan kegunaannya. Pada tahun 1939, seorang ahli kimia Swiss Paul Hermann Muller menemukan bahwa DDT dapat digunakan sebagai insektisida (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009). Serangga, khususnya nyamuk dan kutu telah menyebabkan kematian. Pada abad pertengahan wabah pes atau "*black death*" telah membunuh hampir sepertiga populasi Eropa yang disebabkan oleh kutu, sedangkan pada abad keduapuluh malarial dan penyakit kuning merupakan penyakit penyebab hilangnya jutaan hidup (Solomons, 2011). Selama perang dunia II, DDT disemprotkan seluruh bagian dunia upaya untuk menghancurkan serangga. Upaya ini untuk melawan penyakit yang dibawa oleh serangga, khususnya malaria, demam kuning, penyakit tidur (disebabkan oleh lalat tsetse), dan tipus (Solomons, 2011). Pada tahun 1944, Amerika Serikat telah

memproduksi DDT sebanyak 4366 ton. Pada tahun berikutnya, Amerika Serikat meningkatkan produksi mencapai 15079 ton. Senyawa yang disintesis dari prekursor klorobenzen dan trikloroasetaldehyd dengan katalisis asam sulfat seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1 dirilis secara komersial pada tanggal 31 Agustus 1945 (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009).



Gambar 2.1 Sintesis DDT (Solomons, 2011).

Popularitas DDT semakin melejit setelah menunjukkan keefektifan yang tak tertandingi untuk mengontrol penyakit malaria dan tipus selama perang dunia sehingga Muller dinobatkan sebagai penerima hadiah Nobel pada tahun 1948 dalam bidang obat-obatan atas penemuan sifat insektisida. National Akademik Sain menyatakan bahwa penggunaan DDT selama beberapa waktu telah mencegah lebih dari 500 juta kematian yang disebabkan oleh malaria (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009; Solomons, 2011). Setelah masa perang berakhir, DDT diaplikasikan sebagai insektisida dibidang pertanian (Porto dkk., 2011). Gambar 2.2 menunjukkan bahwa di Amerika Serikat pernah produksi maksimum DDT pada tahun 1963 kira-kira mencapai 600.000 ton (1,35 milyar) dan penggunaan maksimum pada tahun 1959 (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2011). Banyak penelitian sebelumnya melaporkan bahwa DDT dikonversikan ke dalam dua metabolisme utama yaitu 1,1-dikloro-2,2-bis (4-klorofenil) etilen atau dikloro difenil dikloroetilene (DDE) dan 1,1-dikloro-2,2-bis (4-klorofenil) etana atau dikloro difenil dikloroetana (DDD). DDD terbentuk akibat mikroba dan reaksi kimia, sedangkan DDE terbentuk melalui reaksi fotokimia dengan adanya sinar matahari dan melalui dehidroklorinasi oleh bakteri dan hewan (Aislabie dkk., 1997).



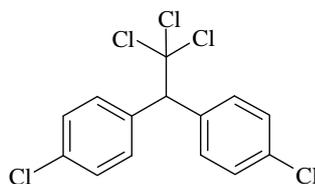
Gambar 2.2 Produksi dan penggunaan DDT pada tahun 1944-1970 di Amerika Serikat (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009).

Seorang ahli biologi Rachel Carson mulai menunjukkan contoh-contoh kerusakan lingkungan yang disebabkan oleh DDT, hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan DDT yang luar biasa menyebabkan dampak yang berbahaya seperti yang dituliskan di dalam bukunya yang berjudul “*Silent Spring*” (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009; Porto dkk., 2011). Karena sifat DDT yang tahan lama dan beracun, pada tahun 1972 Amerika Serikat mulai melarang penggunaan DDT dan Badan perlindungan lingkungan Amerika Serikat mengklasifikasikan DDT, DDD dan DDE (DDTs) sebagai polutan (Yang dkk., 2008). Oleh karena itu pada tahun 1970-1980 penggunaan DDT dalam bidang pertanian telah dilarang (Porto dkk., 2011).

Meskipun penggunaannya telah dilarang di beberapa negara, namun DDT masih digunakan sebagai insektisida pada bidang pertanian sedangkan di bidang kesehatan masyarakat menggunakan DDT sebagai penyemprot nyamuk untuk menghindari penyakit menular seperti malaria dan demam berdarah pada beberapa negara berkembang (Foght dkk., 2001; Porto dkk., 2011). Berdasarkan konvensi stockholm, negara yang memproduksi DDT antara lain: India, Cina dan Korea Utara. Cina rata-rata produksi DDT selama periode 2000-2004 sebanyak 4500 ton, sehingga beberapa daerah di Cina terdeteksi kandungan residu DDT di dalam air,

tanah, udara dan bahan makanan masih tinggi. Sedangkan negara India pada tahun 2007 memproduksi DDT sebanyak 6300 ton yang digunakan untuk menanggulangi penyakit malaria dan leishmaniasis (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009; Yang dkk., 2008).

DDT berupa kristal atau bubuk putih tidak berbau dengan rumus molekul $C_{14}H_9Cl_5$, berat molekul 354.49 g/mol, densitas 0.98-0.99 g/cm³, kelarutan dalam air 0.025 mg/L pada suhu 25°C, larut dalam pelarut organik antara lain etil eter dan aseton, tekanan uap 1.60×10^{-7} pada suhu 20°C dan titik leleh 109°C (Cheremisinoff dan Rosenfeld, 2009). Waktu paruh senyawa ini dalam air adalah 30-60 hari tetapi lebih lama 2-15 tahun jika di dalam organisme hidup, sedangkan waktu paruh DDE di dalam tubuh manusia adalah 7-11 tahun (Bonde dan Toft, 2011). Senyawa yang mempunyai struktur seperti yang ditunjukkan Gambar 2.3 sangat hidrofobik dan hampir tidak larut dalam air, dimana senyawa ini terputus oleh fotolisis dan biodegradasi secara aerobik dan anaerobik.



Gambar 2.3 Struktur DDT (Solomons, 2011).

DDT larut dalam lemak dan cenderung terakumulasi pada jaringan lemak pada kebanyakan hewan. Pada rantai makanan, DDT didalam air akan diserap oleh mikroplankton. Konsentrasi di dalam tubuh mikroplankton akan meningkat sampai puluhan kali dibanding yang berada di dalam air. Mikroplankton-mikroplankton tersebut kelak akan dimakan oleh zooplankton, kemudian zooplankton tersebut dimakan oleh ikan kecil, konsentrasi DDT didalam tubuh ikan tersebut lebih meningkat. Bila ikan kecil tersebut dimakan oleh burung atau dimakan oleh manusia, maka konsentrasinya akan semakin memperbesar (Solomons, 2011; Yuantari, 2011). DDE telah ditemukan pada pembentukan sel telur pada kebanyakan burung, menyebabkan penghambatan kerja enzim karbonat anhidrase yang mengontrol ketersediaan kalsium pada pembentukan sel. Sebagai

akibatnya, sel sangat rapuh dan tidak dapat bertahan hingga waktu penetasan (Solomons, 2011). Ambang batas aman residu DDT yang aman dikonsumsi manusia dalam air minum sebesar 0,05 mg/L dan nilai maksimum konsentrasi DDT dalam udara yang diperkenankan di sekitar lingkungan kerja adalah sebesar 1 mg/m³ (Ashari, 2014). Paparan langsung DDT dengan jumlah yang rendah mengakibatkan gejala-gejala seperti sakit kepala, mual, muntah, kebingungan, dan tremor.

DDT dan hasil metaboliknya terkumpul dalam sumber makanan dan jaringan adipose pada organisme yang terakumulasi dalam tubuh yang mengakibatkan beberapa masalah diantaranya penipisan kulit telur, menyerang sistem jaringan pusat, merusak DNA dalam sel darah, rusaknya sistem endokrin burung dan mamalia, menurunnya kemampuan reproduksi laki-laki, mengganggu sintesis dan metabolisme hormon endogen, gangguan hormon seks, meningkatkan produksi tumor, kanker pankreas dan kanker payudara (Ahmad dkk., 2010; Purnomo dkk., 2010; Purnomo dkk., 2011). Oleh karena itu perlu dikembangkan metode remediasi untuk membersihkan limbah residu DDT sehingga aman bagi lingkungan. Remediasi dapat dilakukan secara fisika dan kimia akan tetapi memerlukan biaya yang lebih mahal dan merusak lingkungan sehingga perlu adanya remediasi secara biologis yang aman dengan biaya murah yaitu biodegradasi.

2.3 Biodegradasi

Biodegradasi adalah salah satu proses bioremediasi atau proses menurunkan tingkat kontaminan menjadi senyawa yang kurang berbahaya atau tidak beracun dengan menggunakan organisme (jamur dan bakteri) sebagai agen pendegradasi. Organisme diketahui mempunyai kemampuan dalam mengubah atau menurunkan senyawa-senyawa xenobiotik (Porto dkk., 2011). Banyak penelitian melaporkan bahwa organisme telah mendegradasi kontaminan seperti hidrokarbon, minyak tanah, polisiklik aromatik hidrokarbon (PAHs), pentaklorofenol (PCP), poliklorinated bifenil (PCBs) dan pestisida (Juhasz dan

Naidu, 1999). Jamur merupakan organisme yang kuat dan lebih toleransi terhadap polutan kimia pada konsentrasi tinggi (Gadd, 2001). Jamur yang biasa digunakan dalam biodegradasi adalah jamur pelapuk coklat dan jamur pelapuk putih. *White rot fungi* (WRF) atau Jamur pelapuk putih mendegradasi senyawa xenobiotik dengan menggunakan enzim ligninolitik diantaranya: lignin peroksidase, mangan peroksidase dan lakase (Lee dkk., 2014). Beberapa WRF yang dapat digunakan untuk mendegradasi antara lain: *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, dan *Trametes versicolor*. Baru-baru ini Ashari pada tahun 2014 menggunakan jamur *P. ostreatus* untuk degradasi DDT dengan penambahan 3 ml bakteri *P. aeruginosa* menghasilkan persen degradasi sebesar 85,74 % yang diinkubasi selama 7 hari. Sedangkan jamur pelapuk coklat menggunakan radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) dari reaksi Fenton dalam degradasinya (Purnomo dkk., 2008).

Selain menggunakan jamur, biodegradasi dapat dilakukan menggunakan bakteri. Bakteri merupakan organisme yang mempunyai penyebaran terluas di alam, bentuk kehidupan tertua dan sampai sekarang masih ada di dunia. Bakteri dapat bertahan hidup karena ukurannya yang kecil yaitu panjang 1-3 μm dan diameter 0,5-1 μm . Bakteri mampu hidup pada berbagai habitat dan mampu menguraikan senyawa-senyawa kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana untuk memperoleh zat-zat tertentu yang dibutuhkan dalam rangka mempertahankan hidupnya (Lay dan Hastowo, 1992; Hatmanti, 2000). Beberapa bakteri yang dapat digunakan untuk biodegradasi diantaranya: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *R. pickettii*, dan *Sphingobacterium sp.* Barragán-Huerta dkk. (2007) melaporkan bahwa *P. aeruginosa* mampu mendegradasi endosulfan 51%, sedangkan konsentrasi DDT yang belum terdegradasi sebesar 32-37% dalam media biji kopi pada suhu 30°C masa inkubasi 7 hari. Fang dkk. (2010) menggunakan bakteri strain *Sphingobacterium sp* untuk degradasi DDT konsentrasi antara 1-50 mg L^{-1} pada suhu 30°C.

Biodegradasi dapat dilakukan dalam keadaan aerobik, dimana degradasinya melibatkan oksigen, sedangkan anaerobik tidak membutuhkan oksigen dalam proses degradasinya. Biodegradasi juga dapat dilakukan dengan menggabungkan dari kedua kondisi aerob dan anaerob (Erkurt, 2010). Proses

akhir dari biodegradasi yaitu proses mineralisasi akan menghasilkan senyawa-senyawa anorganik antara lain CO_2 , H_2O , SO_4^{2-} dan NO_3^- (Bennet dkk., 2002; Wang dkk., 2014). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses biodegradasi antara lain komposisi media, pH, sumber karbon, nitrogen, waktu inkubasi, kekuatan ionik, dan konsentrasi dari senyawa yang akan didegradasi (Singh, 2006). Beberapa kelebihan dari metode biodegradasi antara lain dapat dilaksanakan di lokasi atau diluar lokasi, murah, ramah lingkungan dan menghapus resiko jangka panjang (Ashari, 2014).

2.4 Jamur Pelapuk Coklat

Brown Rot Fungi (BRF) atau Jamur pelapuk coklat merupakan jamur yang menggunakan radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi Fenton dalam degradasi selulosa dan hemiselulosa pada kayu dengan memodifikasi lignin yang ada di sekitarnya (Niemenmaa, 2008). Semua BRF yang tergolong *basidiomycetes* yang umumnya *polyporales* dan sebagian besar berasosiasi pada konifer dan tumbuhan biji terbuka. Lignin yang dimodifikasi akan mengalami reaksi demetilasi, oksidasi parsial dan depolimerisasi. Jamur ini termasuk golongan jamur basidiomisetes yang merupakan kolompok utama pendegradasi lignoselulosa yang digunakan sebagai sumber karbon dan energi (Munir, 2008; Joo ddk, 2009). Selulosa merupakan polimer linear yang terdiri dari bagian-bagian D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan 1,4- β -glukosida (Joo dkk., 2009). Sebelum mendegradasi selulosa jamur pelapuk coklat harus menembus lignin dan hemiselulosa terlebih dahulu agar dapat mengakses selulosa, karena mikrofibril selulosa diselimuti oleh matrik lignin-hemiselulosa.

Lignin merupakan biopolimer yang melekat pada polimer polisakarida dalam dinding sel dan sangat *resists* terhadap degradasi kimia ataupun enzimatik sehingga tahan terhadap serangan mikroba. Jamur pelapuk coklat tidak dapat mendegradasi lignin tetapi memodifikasi struktur lignin dengan cara melakukan demetilasi, depolimerisasi dan repolimerisasi (Arantes dkk., 2012; Niemenmaa, 2008). Ukuran enzim selulase yang dihasilkan dari jamur pelapuk coklat terlalu

besar untuk berdifusi ke dalam dinding sel kayu, oleh karena itu jamur pelapuk coklat menggunakan $\bullet\text{OH}$ untuk melakukan depolimerisasi matrik lignin-hemiselulosa dan menghancurkan struktur matrik pada kayu. Matrik lignin-hemiselulosa yang telah hancur akan memudahkan $\bullet\text{OH}$ menyerang cincin aromatik dalam lignin melalui reaksi hidroksilasi dan mengakibatkan terbukanya cincin aromatik (Kaneko dkk., 2005). Radikal hidroksil dalam degradasi matrik diperoleh dari reaksi Fenton antara besi (Fe^{2+}) dan hidrogen peroksidase (H_2O_2). H_2O_2 diproduksi oleh jamur pelapuk coklat dari reduksi oksigen dan oksidasi metanol. Metanol merupakan hasil demetilasi dari substruktur lignin selama proses degradasi (Arantes dkk, 2012). Jamur pelapuk coklat juga memproduksi asam oksalat, keberadaan asam oksalat dapat mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dengan adanya cahaya. Dengan cara ini asam oksalat terlibat dalam memproduksi Fe^{2+} dan H_2O_2 untuk menghasilkan $\bullet\text{OH}$ (Kaneko dkk., 2005).

Selain menggunakan radikal hidroksil jamur pelapuk coklat juga menggunakan enzim selulosa dan xilanase. Enzim xilanase dapat menghidrolisis hemiselulosa menjadi xilosa (Septiningrum dan Moeis, 2008). Xilan merupakan komponen utama hemiselulosa yang memiliki tulang punggung rantai D-xilopiranosida dengan ikatan glikosidik β -1,4. Xilan memiliki residu O-asetil, arabinosil dan 4-O-metil-D-asam glukoronat yang terikat pada tulang punggungnya (Meryandini dkk., 2008). Berdasarkan substrat yang dihidrolisis, *xilanase* dapat diklasifikasikan menjadi *β -xilosidase*, *eksoxilanase*, dan *endoxilanase*. *B-xilosidase* adalah *xilanase* yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. *Eksoxilanase* adalah *xilanase* yang mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa dan oligosakarida rantai pendek, sedangkan *Endoxilanase* merupakan *xilanase* yang mampu memutus ikatan β 1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur (Richana dkk, 2008).

Enzim selulosa untuk mengkonfersi selulosa menjadi glukosa. Sistem enzim selulase terdiri atas tiga bagian antara lain enzim *endo- β -1,4-glukanase* (EBG); *Cellobiohidrolase* (CBH); dan *β -glukosidase* (BGL). Jamur pelapuk coklat menggunakan enzim *endo- β -1,4-glukanase* untuk memotong ikatan β -1,4

didalam makromolekul, sehingga menghasilkan potongan-potongan besar berbentuk rantai dengan ujung-ujung bebas. Enzim *Cellobiohidrolase* berfungsi untuk memotong mulai dari ujung rantai disakarida sehingga dapat membentuk selobiosa. Selobiosa yang terbentuk akan di hidrolisis oleh jamur pelapuk coklat menggunakan enzim β -glukosidase untuk menghasilkan glukosa (Schlegel, 1994).

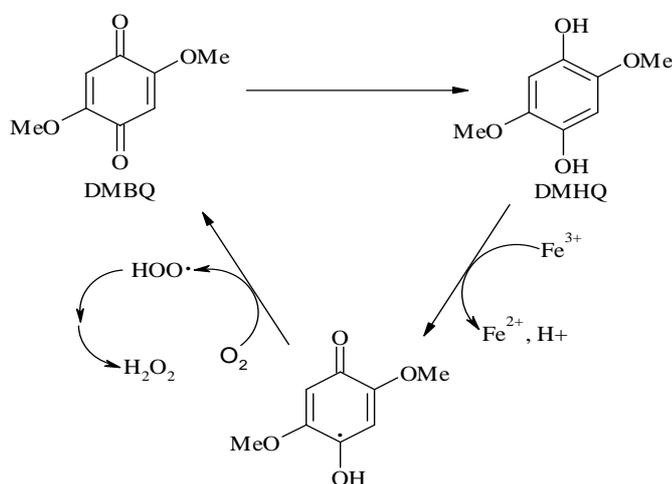
Kayu yang telah didegradasi oleh jamur pelapuk coklat berubah menjadi berwarna gelap dan coklat yang mengindikasikan bahwa adanya modifikasi lignin pada kayu. Pada akhir degradasi kayu berubah menjadi lapuk, rapuh dan mudah terurai menjadi bubuk berwarna coklat (Niemenmaa, 2008). Kemampuan jamur pelapuk coklat dalam degradasi telah dilaporkan sebelumnya oleh Purnomo dkk., pada tahun 2008. Jamur pelapuk coklat antara lain *F. pinicola*, *Gleophyllum trabeum*, dan *Daedalea dickinsii* mampu mendegradasi DDT sebesar 84%, 87% dan 81% yang diinkubasi selama 28 hari dalam kultur murni. Pada tahun 2011 purnomo dkk., melaporkan kembali bahwa jamur *F. pinicola*, *Gleophyllum trabeum*, dan *Daedalea dickinsii* mampu mendegradasi DDT dalam tanah sebesar 29%, 43% dan 32%. Perlatti dkk. (2013) menggunakan beberapa BRF untuk mendegradasi 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (1,2,3,4-TCDD), senyawa ini merupakan salah satu molekul yang paling beracun karena bersifat mutagenik, teratogenik dan karsinogenik. Hasil ini membuktikan bahwa jamur pelapuk coklat dapat digunakan untuk mendegradasi polutan organik.

2.5 *Gloeophyllum trabeum*

G. trabeum atau yang mempunyai nama latin *Lenzites trabeum* merupakan jamur pelapuk coklat berkayu yang sangat aktif diantara spesies lain. Jamur ini dapat bertahan dan tumbuh dengan baik pada suhu tinggi antara 25-46°C dan mampu bertahan pada suhu 60-80°C selama beberapa jam. *G. trabeum* menggunakan reaksi Fenton untuk menghasilkan radikal hidroksil (\bullet OH), oksidan kuat yang terlibat dalam degradasi kayu. Selain itu, jamur ini menghasilkan senyawa dengan berat molekul rendah yang diberi nama Gt chelator yang mengkatalisis reduksi ion ferric menjadi ion ferrous yang digunakan untuk reaksi

Fenton (Niemenmaa, 2008). Jamur ini menghasilkan etanol dibawah kondisi anaerobik dan enzim hidrolitik seperti *selulase* dan *xilanase* (Aguiar dkk., 2013). Kedudukan jamur *G. trabeum* dalam dunia fungi adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Fungi
 Filum : Basidiomycota
 Kelas : Basidiomycetes
 Ordo : Polyporales
 Family : *Gloeophyllaceae*
 Marga : *Gloeophyllum*
 Spesies : *Gloeophyllum trabeum* (Wang dkk., 2005)



Gambar 2.4 Jalur yang diusulkan dari reduksi Fe³⁺ dan produksi H₂O₂ oleh *G. trabeum* (Kerem dkk., 1999).

Metabolit ekstraseluler 2,5- dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) dideteksi dari *G. trabeum* sebagai komponen kunci dalam siklus reaksi Fenton. Siklus reaksi Fenton oleh *G. trabeum* telah dilaporkan oleh Kerem dkk. (1999) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.4, dimana DMBQ diidentifikasi sebagai komponen penting dari sistem oksidatif seluler *G. trabeum* untuk dioperasikan pada siklus redoks. Miselium jamur mereduksi DMBQ menjadi 2,5-dimethoxy-1,4-hydroquinone (DMHQ). DMHQ mereduksi Fe³⁺ menjadi Fe²⁺ dan memproduksi H₂O₂ ekstraseluler melalui reaksi nonenzimatik. Jalur ini memberikan bukti bahwa *G. trabeum* menggunakan sebuah reaksi Fenton yang

didorong benzoquinone untuk memproduksi radikal hidroksil. *G. trabeum* mempunyai sistem siklus reaksi Fenton, sehingga dapat memproduksi H₂O₂ dengan jumlah yang lebih besar. Meningkatnya jumlah H₂O₂ yang dihasilkan menyebabkan meningkatnya jumlah radikal hidroksil yang dihasilkan oleh *G. trabeum* (Purnomo dkk., 2011).

2.6 Reaksi Fenton

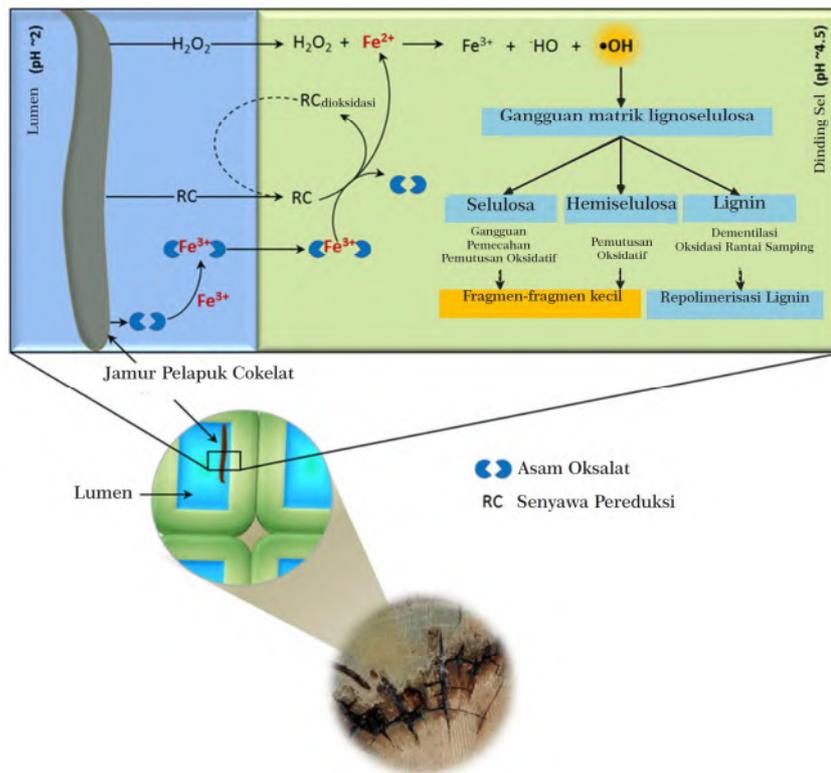
Fenton Chemistry merupakan oksidasi zat organik oleh Fe²⁺ dan H₂O₂. Pertama kali digambar oleh H.J.H, Fenton untuk pertama kalinya mengamati pada oksidasi asam tartarik oleh H₂O₂ dengan adanya Fe²⁺. Nama yang sering digunakan reaksi Fenton atau reagen Fenton. Reaksi Fenton sudah dikenal lebih dari satu abad, tetapi belum diketahui aplikasinya dalam mengatasi polutan organik (Barbunsinski, 2009). Pada tahun 1960 an, reaksi Fenton pertama kali dilaporkan keterlibatannya dalam biodegradasi kayu, ketika Halliwell pada tahun 1965 mengamati selulosa yang dapat didegradasi oleh radikal bebas Fenton. Reaksi Fenton didasarkan pada reaksi antara peroksida (H₂O₂) dan ion besi dalam media asam untuk membentuk oksigen reaktif. Radikal hidroksil yang reaktif terbentuk dari reaksi antara Fe²⁺ dan hidrogen peroksida (Arantes dkk., 2012). Reagen Fenton terbukti efektif digunakan untuk penghancuran limbah beracun. Oleh karena itu, reaksi Fenton banyak diaplikasikan untuk mengatasi limbah industri seperti amina aromatik, pewarna, pestisida, surfaktan dan bahan peledak sebaik zat-zat lain (Barbunsinski, 2009).

Persamaan reaksi Fenton sebagai berikut:



Fe³⁺ (dihasilkan dari Fe²⁺) dan selanjutnya dapat membentuk mekanisme sebagai berikut:



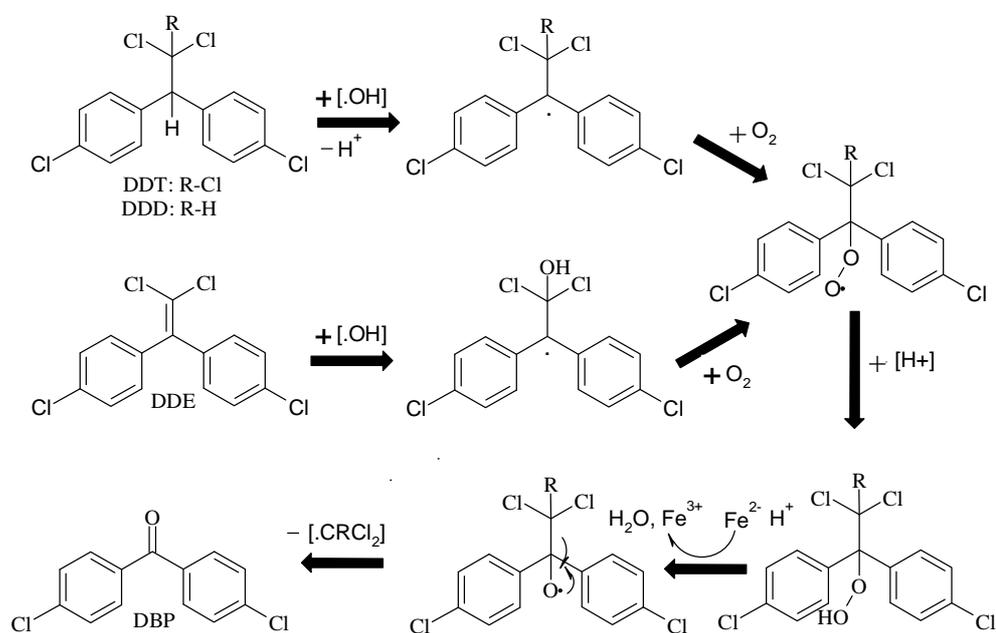


Gambar 2.5 Mekanisme reaksi Fenton oleh BRF dalam degradasi kayu (Arantes dkk., 2012).

Beberapa penelitian menjelaskan mekanisme sederhana untuk Fe²⁺ dan H₂O₂, dan degradasi makrokomponen dinding sel tanaman utama oleh jamur pelapuk coklat melalui •OH hasil reaksi Fenton seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.5. Hifa jamur pelapuk coklat yang tumbuh di dalam lumen menghasilkan asam oksalat, besi mereduksi senyawa (RC), dan hidrogen peroksida (H₂O₂). Asam oksalat berikatan dengan Fe³⁺, dan kompleks berdifusi ke dalam dinding sel. H₂O₂ dan RC juga berdifusi ke dalam dinding sel, dimana Fe³⁺ dari kompleks Fe-oksalat direduksi menjadi Fe²⁺. Kemudian Fe²⁺ bereaksi dengan H₂O₂ yang disebut reaksi Fenton dan menghasilkan radikal hidroksil (•OH).

Setelah terjadi penyerangan OH radikal, matrik lignoselulosa terganggu. Pada tahap pembusukan, perubahan utama adalah pemutusan ikatan glikosida pada selulosa, hemiselulosa dan demetilasi lignin, depolimerisasi dan repolimerisasi (Arantes dkk., 2012).

Purnomo dkk. (2008) melaporkan keterlibatan radikal hidroksil dari reaksi Fenton dalam degradasi DDT. Mekanisme transformasi langsung DDT, DDE, dan DDD menjadi DBP seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.6. Hidrogen benzylik yang berada diantara dua cincin dengan mudah diserang oleh radikal hidroksil, menghasilkan resonansi yang stabil, membentuk radikal benzylik pada carbon ditengah. Kemudian radikal ini akan bereaksi dengan oksigen, menghasilkan radikal peroksil, selanjutnya radikal peroksil akan menyerang hidrogen disekitar untuk menghasilkan peroksida. Adanya Fe^{2+} , peroksida akan tereduksi menjadi radikal alkoksil, dimana melalui pemotongan beta menghasilkan benzofenon (DBP) dan radikal triklorometil ($\bullet CCl_3$). Jalur yang sama untuk senyawa DDD, menghasilkan DBP dan radikal diklorometil ($\bullet CHCl_2$).



Gambar 2.6 Mekanisme penyerangan radikal hidroksil dari reaksi Fenton (Purnomo dkk., 2008).

2.7 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa merupakan bakteri anggota dari famili *pseudomonadaceae*, gram negatif, tidak fermentatif, motil dengan flagela monotrikous, tidak membentuk spora, dan berbentuk batang (panjang 1.5-3.0 μm dan diameter 0.5-0.7 μ). Bakteri ini mampu tumbuh pada media sederhana yang menggunakan bermacam-macam senyawa organik dengan berat molekul rendah dan mampu hidup pada kondisi aerob dan anaerob, selain itu *P. aeruginosa* resistan terhadap bermacam-macam antibiotik (Fox dkk., 2007). Selama tahun 1880-an *P. aeruginosa* pertama kali diisolasi dari luka dangkal yang berada di Prancis, kemudian diberi nama *Bacillus pyocyaneus*. Pada tahun 1882 di Prancis, Carle Gessard (1850-1924) mengisolasi bakteri ini dari nanah hijau-biru pada luka yang dangkal. Nama bakteri ini diambil dari *bacillus* yang artinya batang, *pyo* yang artinya nanah, dan *cyaneus* yang artinya biru. Sekarang ini berubah menjadi (*pseudo*) hijau (*aeruginosa*) muncul bentuk bagian etiologi dasar dari infeksi (*monad*) (Villavicencio, 1998; Fox dkk., 2007). Bakteri ini menghasilkan biosurfaktan yang disebut rhamnolipid (Mulligan, 2004). Kedudukan *P. aeruginosa* dalam dunia bakteri adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonadaceae
Marga	: Pseudomonas
Spesies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Peix dkk., 2009)

2.8 *Bacillus subtilis*

B. subtilis adalah salah satu bakteri yang bersifat termofilik fakultatif yang menghasilkan enzim protease. Enzim protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein (Kosim dan Putra, 2010). Bakteri berbentuk batang (basil), gram-positif, aerobik (Jeyaram dkk., 2011;

Wang dkk., 2014). Biasanya bakteri ini ditemukan di tanah, air, dan sekumpulan tanaman-tanaman. Senyawa metabolit produk yang dihasilkan oleh *B. subtilis* secara luas diteliti sebagai agen kontrol pertumbuhan tumbuhan biologi, pengawet makanan seperti antibiotik dan obat-obatan pada hewan. *B. subtilis* menghasilkan surfaktan dan senyawa non peptida seperti poliketida dan fosfolipid yang digunakan sebagai antimikrobia (Wang dkk., 2014). Kedudukan *B. subtilis* dalam dunia bakteri adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Bacillaceae
Marga : Bacillus
Spesies : *Bacillus subtilis*

2.9 *Ralstonia pickettii*

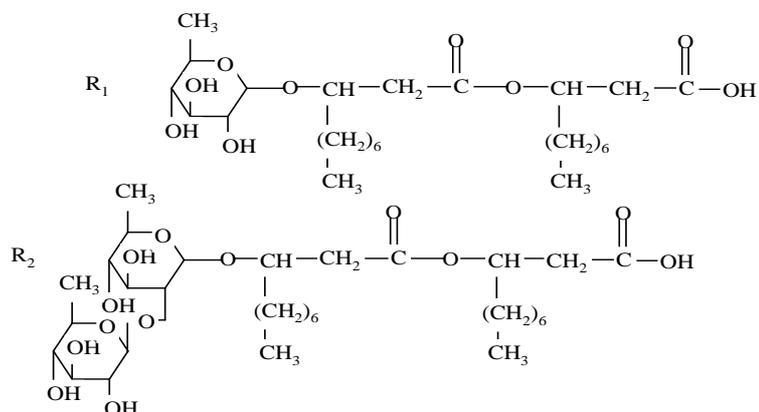
R. pickettii merupakan bakteri aerobik, gram negatif, oksidasi positif, batang non fermentatif dan mikroorganisme yang dapat ditemukan di dalam air dan tanah. *R. Pickettii* telah diidentifikasi sebagai pembentuk biofilm di pipa air plastik. Organisme yang mampu untuk bertahan dan berkembang dalam kondisi yang rendah nutrisi dan mempunyai kemampuan untuk biodegradative. *R. pickettii* mampu degradasi senyawa-senyawa beracun antara lain; *benzene, meta-cresol, ortho-cresol, para-cresol, 1,4-dioxine, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 3,4-dichloro propion anilide, 2,3 dan 4-monochloro phenol, N-nitroso dimehylamine, nitrobenzene, pentacyclic triterpenoids, phenol, quinoline, toluene, trichloroethylene, 2,4,6-trichloro phenol dan pentachloro phenol*. Bakteri ini merupakan bakteri yang diisolasi dari berbagai spesimen klinis termasuk darah, urine dan cairan serebrospinal (Ryan dkk., 2006). Bakteri ini diisolasi dari air, tanah, tumbuh-tumbuhan, buah-buahan dan sayur-sayuran (Girlich dkk., 2006). *R. pickettii* dikenal juga dengan istilah *Burkholderia pickettii, Burkholderia solanacearum, dan Alcaligenes eutrophus* (Coenye dkk., 2003). Bakteri ini

menghasilkan enzim lipase sekitar 24.75 U/ml per menit (Hemachander, 2001).
Kedudukan *R. Pickettii* dalam dunia bakteri adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Bacteria
 Devisi : Proteobacteria
 Kelas : Beta Proteobacteria
 Ordo : Burkholderiales
 Famili : Ralstoniaceae
 Marga : Ralstonia
 Spesies : *Ralstonia pickettii* (Coenye dkk., 2003)

2.10 Biosurfaktan

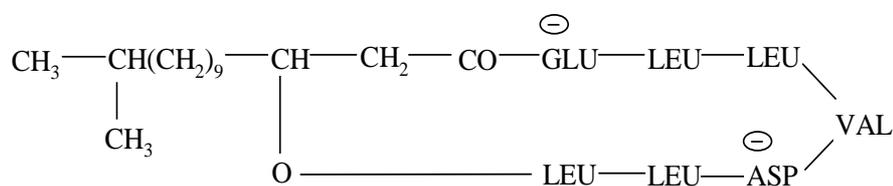
Biosurfaktan merupakan surfaktan yang dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme seperti bakteri, ragi dan jamur. Biosurfaktan memiliki gugus hidrofobik dan gugus hidrofilik. Gugus hidrofilik terdiri atas gugus asam amino, karbohidrat, peptida siklik, fosfat, asam karboksilat dan alkohol, sedangkan gugus hidrofobik terdiri atas asam lemak rantai panjang, hidroksi asam lemak atau α -alkil- β -hidroksi asam lemak. Biosurfaktan dapat menjaga sifatnya bahkan dibawah kondisi pH, suhu dan salinitas yang ekstrim biodegradabilitasnya, toksisitasnya yang rendah dan melarutkan senyawa dengan kelarutan yang rendah (Mulligan, 2005; Pornsunthorntaweew dkk., 2008).



Gambar 2.7 Struktur berbeda rhamnolipid yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa* (Mulligan, 2005).

Bakteri *P. aeruginosa* dapat menghasilkan rhamnolipid dari substrat termasuk C11 dan C12 alkana, suksinat, piruvat, sitrat, fruktosa, gliserol, minyak olive, glukosa dan mannitol. Komposisi dan hasil bergantung pada desain fermentor, pH dan komposisi nutrisi, substrat dan suhu yang digunakan (Mulligan, 2005). Dua jenis rhamnolipid berisi salah satunya dua rhamnososes yang melekat asam β -hidroksidekanoik atau satu rhamnose yang terhubung asam lemak identik seperti yang terlihat pada Gambar 2.7. Plaza dkk. (2007) melaporkan bahwa bakteri *R. pickettii* menghasilkan biosurfaktan yaitu rhamnolipid.

Bakteri *B. subtilis* menghasilkan lipopeptida yang disebut surfaktin seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.8 yang mengandung tujuh asam amino terikat pada gugus karboksil dan hidroksil asam karbon 14. Konsentrasi surfaktin terendah 0.005% dapat mengurangi tegangan permukaan sampai 27 mn/m, membuat surfaktin menjadi salah satu biosurfaktan yang paling kuat (Mulligan, 2005).



Gambar 2.8 Struktur surfaktin *B. subtilis* (Mulligan, 2005).

Beberapa penilitan melaporkan bahwa biosurfaktan yaitu rhamnolipid yang dihasilkan *P. aeruginosa* dalam kultur murni dapat meningkatkan kecepatan biodegradasi hidrokarbon (Folch dkk., 1957; Hisatsuka dkk., 1971; Itoh dkk., 1972; Koch dkk., 1991; Zhang dkk., 1992; Zhang dkk., 1994; Shreve dkk., 1995; Zhang dkk., 1997). Mulligan (2005) melaporkan bahwa biosurfaktan yaitu rhamnolipid dapat meningkatkan biodegradasi dari senyawa heksadekana, oktadekana, *n*-parafin dan penantren. Plaza dkk. (2007) melaporkan bahwa rhamnolipid yang dihasilkan oleh bakteri *R. pickettii* meningkatkan kecepatan degradasi BTEX (benzen, etilbenzen, toluena, dan xilen).

2.11 Jalur Degradasi DDT oleh BRF dan Bakteri

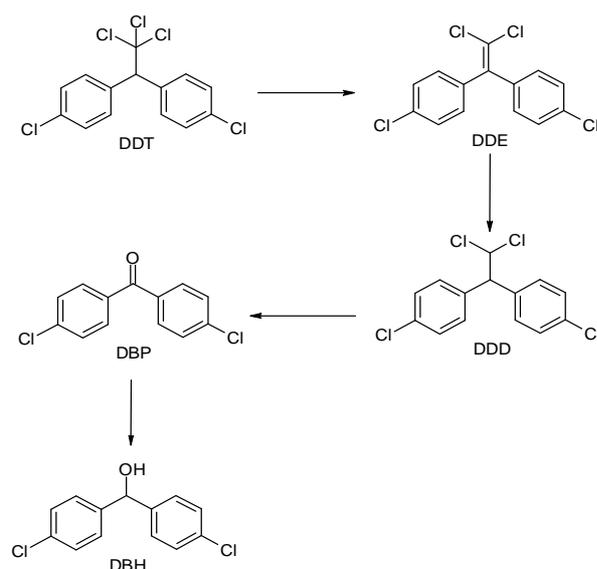
Metabolit yang dihasilkan oleh jamur *G. trabeum* pada penelitian tentang degradasi DDT dengan masa diinkubasi 14 hari seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.1 berikut ini:

Tabel 2.1 Metabolit produk degradasi DDT oleh *G. trabeum*

Subtrat	(%) Degradasi	Metabolik Produk (%)			
		DDE	DDD	DBP	Total
DDT	61.8 ± 6.2	30.1 ± 1.5	22.6 ± 3.8	16.1 ± 0.8	68.8 ± 6.1
DDE	45.9 ± 3.4	-	38.6 ± 4.3	13.9 ± 3.2	52.5 ± 7.5
DDD	32.3 ± 1.1	-	-	26.1 ± 0.5	26.1 ± 0.5
DBP	89.4 ± 1.3	-	-	-	-

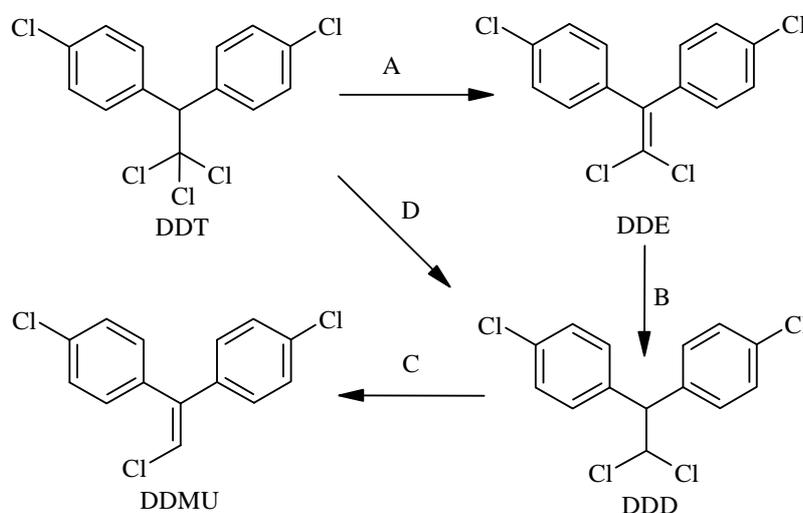
Sumber: Purnomo dkk., 2008

Purnomo dkk. (2008) melaporkan bahwa jalur degradasi DDT oleh *G. trabeum* awalnya mengalami dehidroklorinasi DDT membentuk DDE, diikuti dengan hidrogenasi menjadi DDD. Kemudian DDD mengalami deklorinasi oksidatif membentuk DBP, diikuti reduksi menjadi DBH seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.9. Selama 28 hari *G. trabeum* mampu degradasi DDT sebanyak 87%.



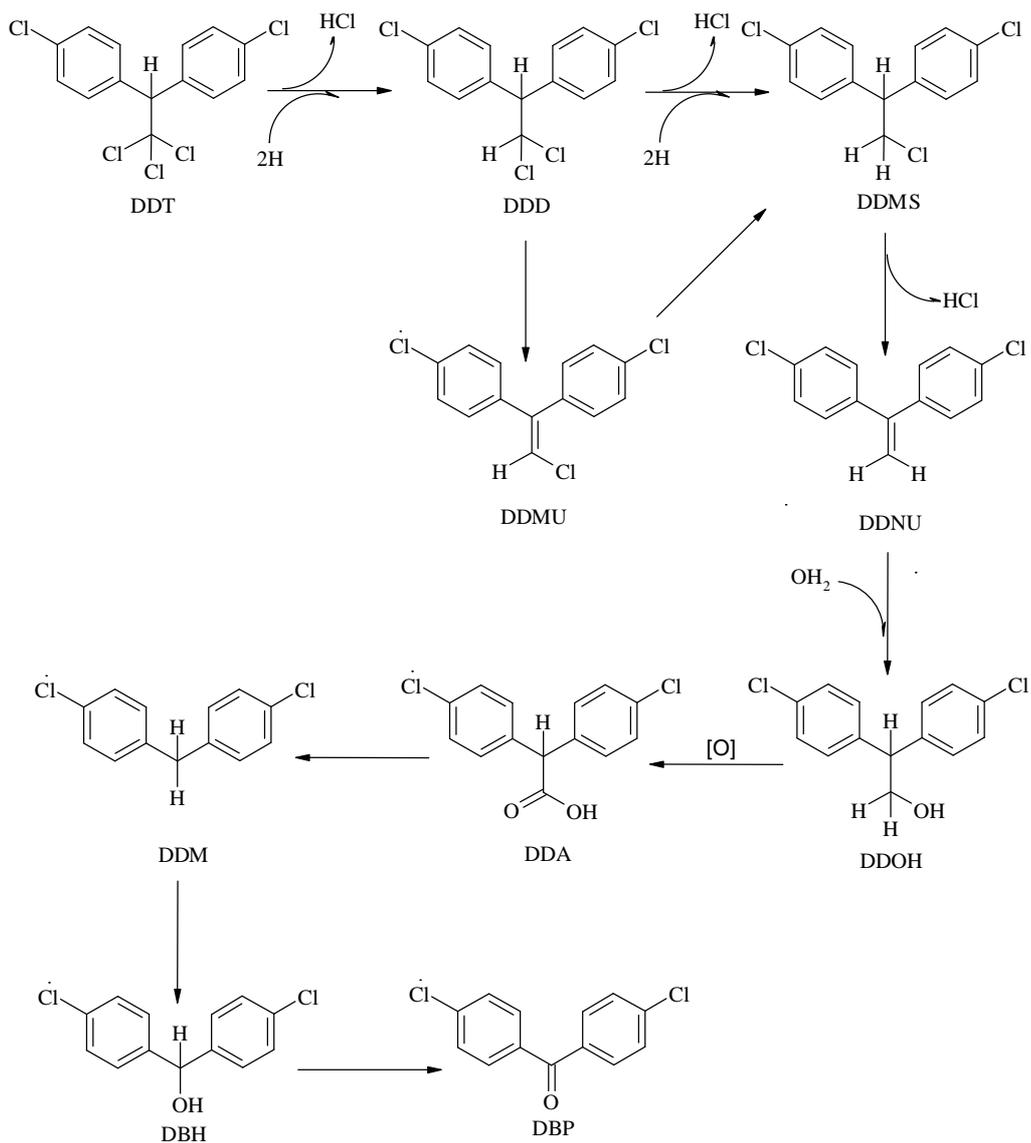
Gambar 2.9 Jalur Degradasi DDT oleh *G. trabeum* (Purnomo dkk., 2008).

Ashari (2014) melaporkan bahwa jalur degradasi DDT oleh *P. ostreatus* dengan penambahan *P. aeruginosa* seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.10. Terdapat dua jalur degradasi DDT, jalur yang pertama DDT mengalami reaksi dehidroklorinasi menjadi senyawa DDE. Kemudian DDE mengalami reaksi hidrogenasi membentuk DDD. Senyawa DDD mengalami deklorinasi membentuk senyawa DDMU. Jalur yang kedua yaitu DDT mengalami reaksi deklorinasi membentuk senyawa DDD dan DDD mengalami reaksi deklorinasi membentuk senyawa DDMU.



Gambar 2.10 Jalur degradasi DDT oleh *P. ostreatus* dengan penambahan *P. aeruginosa* (Ashari, 2014).

Berdasarkan Gambar 2.11 menunjukkan bahwa DDT mengalami reaksi deklorinasi reduktif berulang-ulang hingga membentuk senyawa 2,2-bis (p-klorofenil) etilena (DDNU), kemudian di oksidasi membentuk Senyawa 2,2-bis (p-klorofenil) etanol (DDOH). DDOH dioksidasi membentuk 1,1-dikloro-2,2-bis (p-klorofenil) etana (DDD) dan mengalami dekarboksilasi membentuk senyawa bis(p-klorofenil) metana (DDM). DDM dimetaboliskan menjadi DBP atau mengalami pemutusan salah satu cincin aromatik membentuk asam p-klorofenilacetat (PCPA) (Aislabie dkk., 1997).

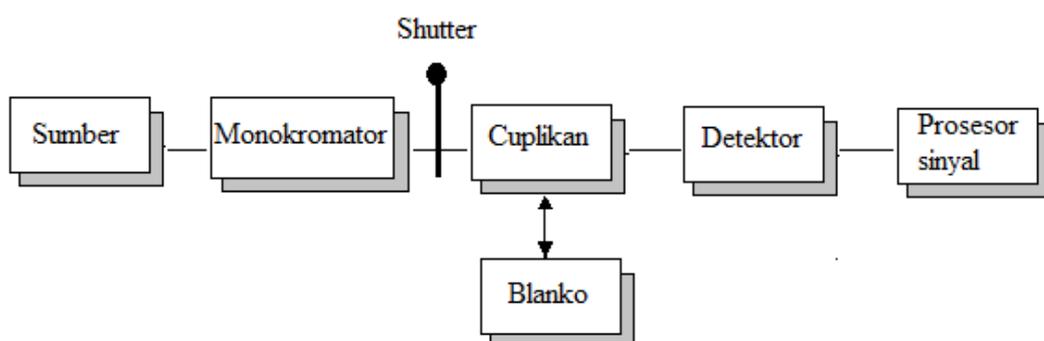


Gambar 2.11 Jalur metabolisme DDT oleh bakteri melalui deklorinasi reduktif yang diusulkan (Aislabie dkk, 1997).

2.13 Spektrofotometer UV-Vis

Spektroskopi absorpsi Ultraviolet dan Visible (UV-Vis) adalah teknik pengukuran pengurangan berkas sinar setelah melewati cuplikan dalam bentuk larutan. Instrumen yang digunakan untuk mengukur absorbansi yang dilengkapi dengan monokromator sebagai penyeleksi panjang gelombang adalah spektrofotometer. Spektrofotometer dibagi menjadi dua yaitu berkas tunggal

(single-beam) dan berkas ganda (double-beam). Spektrofotometer single-beam merupakan spektrofotometer yang paling sederhana dan hanya mempunyai satu berkas cahaya seperti pada Gambar 2.12. Prinsip dasar spektroskopi UV-Vis adalah sumber cahaya dilewatkan monokromator sebagai penyeleksi panjang gelombang kemudian radiasi cahaya akan melewati cuplikan yang dimasukkan ke dalam kuvet tersebut selanjutnya detektor dapat membaca transmisi dari cuplikan sehingga diperoleh nilai absorbansi (Harris, 2007). Pada penelitian ini pengukuran pertumbuhan sel bakteri *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* menggunakan metode turbidimetri pada panjang gelombang 600 nm. Prinsip dasar metode turbidimetri adalah apabila suatu cahaya mengenai sel, maka sebagian dari cahaya tersebut akan diserap dan sebagian lagi akan diteruskan. Jumlah cahaya yang diteruskan berbanding terbalik dengan jumlah sel bakteri (Purwoko, 2007).

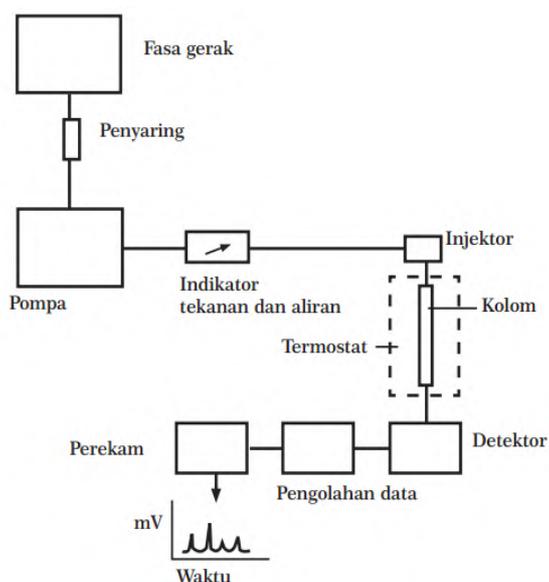


Gambar 2.12 Skema diagram spektrofotometer berkas tunggal (Harvey, 2000).

2.14 HPLC

Kromatografi cair kinerja tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah teknik pemisahan campuran dan perbedaan kecepatan migrasi dari komponen-komponen dalam sampel yang terjadi karena adanya perbedaan kesetimbangan distribusi dalam fasa diam dan fasa gerak (Wonorahardjo, 2013). Cuplikan cair atau padat terlebih dahulu dilarutkan dalam pelarut yang sesuai (Harvey, 2000). Panjang kolom 5-30 cm dan diameter dalam kolom sebesar 1-5 mm (Harris, 2007). Seperti yang terlihat pada Gambar 2.13 yaitu cuplikan diinjeksikan melalui loop, secara bersamaan fasa gerak

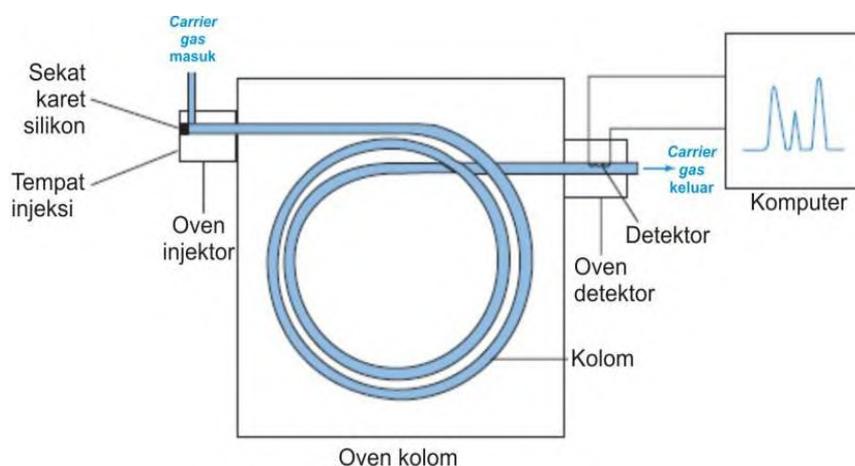
dipompakan dengan kecepatan laju alir sesuai dengan yang diinginkan. Di dalam kolom diameter 2-8 mm akan terjadi interaksi antara cuplikan, fasa diam dan fasa gerak. Interaksi ini yang berpengaruh pada waktu retensi komponen-komponen yang dipisahkan, dimana waktu retensi menunjukkan lama sebuah komponen berada dalam kesetimbangan fasa diam dan fasa gerak sepanjang kolom. Komponen-komponen akan mengalami pemisahan dalam kolom berdasarkan polaritas dan komponen yang telah terpisah satu-persatu akan meninggalkan kolom. Selanjutnya komponen yang telah terpisah akan dideteksi oleh suatu detektor. Detektor yang digunakan dalam HPLC diantaranya detektor ultraviolet, fluoresensi dan flame ionisasi. Senyawa organik biasanya menyerap di daerah UV pada panjang gelombang 254 nm. Hasil dari pendektasian yaitu berupa kromatogram, artinya kumpulan-kumpulan puncak dimana satu puncak mewakili satu senyawa murni dengan intensitas tertentu (Ardrey, 2003). Keunggulan menggunakan HPLC dibandingkan dengan yang lain yaitu dapat memisahkan senyawa-senyawa organik dengan baik dalam waktu singkat dan sempurna (Wonorahardjo, 2013). Pada penelitian ini HPLC digunakan untuk analisis *recovery* DDT, dimana *recovery* bertujuan untuk mengetahui jumlah DDT yang terdegradasi dengan cara membandingkan luas puncak DDT dan piren dari hasil kromatogram HPLC.



Gambar 2.13 Diagram blok instrumen HPLC (Lindsay, 1992)

2.15 GC-MS

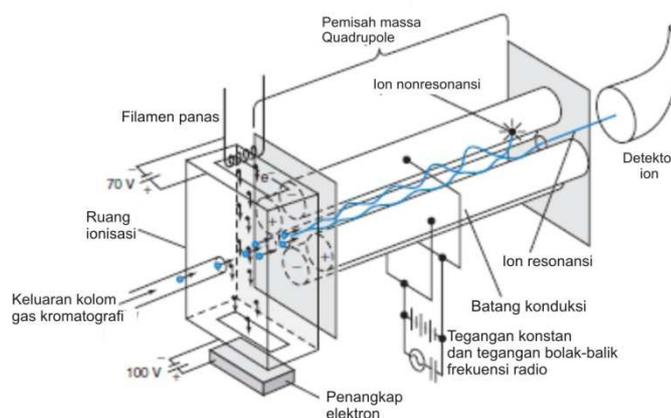
Kromatografi Gas atau *Gas Chromatography* (GC) merupakan instrumen yang digunakan untuk pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran yaitu fasa diam dan gerak. Pada kromatografi gas cuplikan berupa gas atau cairan. Cuplikan diinjeksikan kedalam aliran gas inert fasa gerak (sering disebut gas pembawa). Pada kromatografi gas fasa gerak adalah gas seperti Helium, Argon dan N₂, sedangkan untuk fasa diam adalah cairan nonvolatil yang terikat di bagian dalam kolom. laju alir kolom kapiler 1-25 mL/menit (Harvey, 2000).



Gambar 2.14 Skema diagram kromatografi gas (Harris, 2007).

Berdasarkan skema diagram kromatografi gas yang ditunjukkan pada Gambar 2.14. Cuplikan yang mudah menguap disuntikan melalui lubang sekat berbahan karet ke tempat injeksi yang telah dipanaskan, sehingga cuplikan akan cepat menguap. Uap yang dihasilkan akan dibawa oleh gas pembawa dan mengalami pemisahan di dalam kolom, komponen-komponen yang telah terpisah satu per satu meninggalkan kolom, kemudian jenis atau jumlah tiap komponen campuran dideteksi oleh suatu detektor yang berada diujung kolom. Hasil dari pendeteksian detektor berupa kromatogram (Harris, 2007). Kromatografi gas (GC) yang dikombinasikan dengan spektroskopi massa seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.14 yang dikenal sebutan GCMS.

Spektroskopi massa adalah suatu teknik untuk mempelajari massa atom atau molekul atau fragmen molekul. Prinsip kerja dari spektrometer massa adalah suatu sampel dimasukkan, diuapkan dan diumpangkan dalam suatu aliran yang berkesinambungan ke dalam kamar pengionan. Kamar pengionan dijaga agar tetap dalam keadaan vakum untuk meminimalkan tabrakan dan reaksi antara radikal, molekul udara. Di dalam kamar suatu sampel melewati suatu aliran elektron berenergi tinggi yang menyebabkan ionisasi beberapa molekul sampel menjadi ion-ion molekul. Setelah terbentuk, sebuah ion molekul dapat mengalami fragmentasi dan penataan ulang. Partikel yang berumur panjang yang dapat terdeteksi oleh pengumpul ion, sedangkan yang berumur lebih pendek tidak sempat mencapai pengumpul ion. Sehingga hanya produk-produk fragmentasinya yang menunjukkan puncak dalam spektrum massa (Harris, 2007). Spektra yang dihasilkan adalah hasil pembacaan oleh detektor terhadap ion positif (M^+) sehingga diperoleh berat molekul muatan positif tersebut (m/z) pada spektrum massa. Berdasarkan hal tersebut, proses identifikasi senyawa dapat dilakukan dengan cara interpretasi spektra berdasarkan fragmen-fragmen khas yang dihasilkan (Subandi, 2014). Berikut ini skema diagram spektroskopi massa:



Gambar 2.15 Skema diagram spektroskopi massa (Harris, 2007)

Pada penelitian ini GCMS digunakan untuk analisis DDT dan senyawa metabolit hasil degradasi DDT oleh jamur dan bakteri. Data yang diperoleh dari analisis GCMS yaitu berupa kromatogram, dimana kromatogram mendeteksi beberapa senyawa antara lain piren, DDT, dan metabolit produk pada waktu

retensi yang berbeda-beda. Identifikasi senyawa metabolit produk dilakukan berdasarkan spektra MS hasil analisis dari masing-masing puncak yang ditunjukkan pada kromatogram. Spektra MS hasil analisis secara otomatis akan dicocokkan berdasarkan pola pemecahan molekul yang ada dalam spektra MS data base, sehingga diperoleh senyawa-senyawa yang terdeteksi sebagai metabolit hasil degradasi DDT oleh jamur dan bakteri. Hal ini dilakukan untuk semua senyawa yang telah diidentifikasi dalam penelitian ini.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan steril, jarum ose, erlenmeyer berpenutup, gelas beker, erlenmeyer, spons, gelas ukur, kaca alroji, mikropipet, labu bundar, corong kaca, botol ampul, suntikan, pompa penyedot, corong pisah, filter whatman No.14 diameter 9, neraca analitik (OHAUS), ultrasonic cleaner, evaporator, sentrifuge, autoclave (TOMY, ES-315), inkubator Thermostatchrank/Thermostatic Cabinet/Armoire Thermoregulatrice (Laviband), *Shaker Inkubator* Excella E 25 (New Brunswick), Spektrofotometer SP-300 (Optima), HPLC (Jasco PU-1500 Intelligent pump dan Jasco MD-1510), dan GCMS (Agilent Technologies 7890A GC System).

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah jamur *Gloeophyllum trabeum*, bakteri *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan strain *Ralstonia pickettii* yang diperoleh dari koleksi jamur Laboratorium Kimia Mikroorganisme Jurusan Kimia FMIPA ITS, dikloro difenil trikloroetana (DDT) (Tokyo Chemical Industry Co., Jepang), dikloro difenil dikloroetana (DDD) (Tokyo Chemical Industry Co., Jepang), *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Merck, Darmstadt, Jerman), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Merck, Darmstadt, Jerman), *Nutrient Borth* (NB) (Merck, Darmstadt, Jerman), *Nutrient Agar* (NA) (Merck, Darmstadt, Jerman), etanol 70%, metanol, aseton, aqua DM, Na₂SO₄ anhidrat (Merck Millipore, Darmstadt, Jerman), *n*-heksana (Anhui Fulltime, Cina), dimetil sulfoksida (DMSO).

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Regenerasi Jamur *Gloeophyllum trabeum*

Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur pelapuk coklat dari spesies *G. trabeum*. Jamur ini diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium agar steril (PDA) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari sampai seluruh permukaan medium tertutupi miselium.

3.2.2 Regenerasi Bakteri

Bakteri-bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *B. subtilis*, *P. aeruginosa* dan *R. pickettii*. Ketiga bakteri ini diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium agar NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 24 jam.

3.2.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

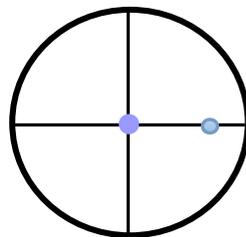
Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk ketiga jenis bakteri yang telah diregenerasi. Satu ose masing-masing bakteri hasil regenerasi diinokulasikan ke dalam 10 ml NB. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 24 jam dan dikocok dengan kecepatan 180 rpm. Sebanyak 1 ml kultur dimasukkan ke dalam medium NB dan diukur secara turbidimetri atau *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) dengan spektrofotometer UV-Vis tiap 1 jam sekali. Kurva pertumbuhan dibuat dengan absorbansi sebagai fungsi waktu. Apabila biakan telah mencapai fase kematian yang ditandai dengan adanya penurunan absorbansi, maka pengukuran dihentikan.

3.2.4 Pembuatan Kurva Standar DDT

Larutan DDT dibuat konsentrasi sebesar 25, 50, 75, 100 % (100% = 0,25 µmol DDT yang berasal dari 50 µL DDT 5 mM). Sebanyak 50 µL piren 5 mM ditambahkan ke dalam masing-masing larutan DDT sebagai internal standar. Sampel dianalisa menggunakan HPLC dengan fasa gerak metanol 83%. Kurva pertumbuhan dibuat dengan nilai perbandingan luas area puncak DDT/piren sebagai fungsi konsentrasi DDT.

3.2.5 Pengaruh Bakteri pada Pertumbuhan *Gloeophyllum trabeum*

Jamur *G. trabeum* diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium agar steril (PDA). Bakteri *B. subtilis*, *P. aeruginosa* dan *R. pickettii* diinokulasikan ke dalam media PDB dan diinkubasi berdasarkan massa stasionernya. Sel bakteri hasil pre-inkubasi, di ambil sebanyak 20 ml dan disentrifugasi selama 10 menit. Biomassa hasil sentrifugasi ditambah air sebanyak 20 mL, kemudian dihomogenkan dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Setelah itu dipisahkan antara biomassa dan supernatan, ditambahkan air destilat 20 ml, dihomogenkan, dan disentrifugasi. Biomassa hasil sentrifugasi ditambah air sebanyak 20 mL, kemudian dihomogenkan. Jamur *G. trabeum* diinokulasikan menggunakan loop berukuran 5 mm ke dalam cawan petri yang berisi medium agar steril (PDA). Kemudian ditambahkan bakteri dengan jarak 4 cm dari *G. Trabeum* seperti yang ditunjukkan Gambar 3.1. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 2 hari. Setelah itu, dilakukan pengukuran pertumbuhan miselium setiap hari sampai seluruh permukaan medium tertutupi miselium. Sebagai kontrol perlakuan sama tanpa penambahan bakteri.



Gambar 3.1 Sketsa peletakan jamur dan bakteri (Kamei dkk., 2012)

3.2.6 Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum*

Kultur *G. trabeum* hasil pre-inkubasi selama 7 hari, masing-masing ditambah 50 μ L dari DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μ mol DDT/labu). Tiap labu ditambahkan oksigen dengan cara mengalirinya melalui selang oksigen yang dimasukkan ke dalam kultur, apabila media kultur sudah jenuh yang ditandai dengan dinginnya permukaan bagian bawah erlemeyer, maka penambahan oksigen dihentikan. Kemudian kultur ditutup sumbat kaca serta diselotip untuk mencegah penguapan DDT. Kultur diinkubasi secara statis selama

7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT.

3.2.7 Pengaruh Jenis Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh *Gleophyllum trabeum* (Screening Bakteri)

Kultur bakteri hasil pre-inkubasi (20, 21, dan 30 jam pada media NB) sebanyak 5 mL ditambahkan ke dalam kultur jamur hasil pre-inkubasi pada 10 mL media PDB selama 7 hari pada suhu 30°C, masing-masing kultur ditambah 50 µL DDT 5mM dalam DMSO (konsentrasi akhir 0,25 µmol DDT/labu). Kemudian PDB ditambahkan ke dalam masing-masing kultur sampai volume total 20 ml. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai kontrol positif. Jenis bakteri dengan kemampuan degradasi terbesar akan digunakan pada proses degradasi DDT selanjutnya.

3.2.8 Pengaruh Jumlah Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum* (Variasi Jumlah Bakteri)

Kultur jamur hasil pre-inkubasi sebanyak 10 mL media PDB selama 7 hari pada suhu 30°C, ditambah dengan kultur *R. pickettii* dengan variasi jumlah bakteri 1, 3, 5, 7 dan 10 mL. Kemudian ditambahkan PDB hingga volume total 20 mL. Masing-masing kultur ditambah 50 µL dari DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir 0,25 µmol DDT/labu). Tiap labu ditambahkan oksigen dengan cara mengalirinya melalui selang oksigen yang dimasukkan ke dalam kultur, apabila media kultur sudah jenuh yang ditandai dengan dinginnya permukaan bagian bawah erlemeyer, maka penambahan oksigen dihentikan. Kemudian kultur ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai

kontrol positif. Jumlah bakteri yang menghasilkan kemampuan degradasi DDT terbesar akan digunakan dalam proses degradasi selanjutnya.

3.2.9 Pengaruh Waktu Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum* (Variasi Waktu Penambahan Bakteri)

Sebanyak 50 μ L DDT 5 mM dalam pelarut DMSO (konsentrasi akhir 0,25 μ mol DDT/labu) ditambahkan ke dalam kultur jamur hasil pre-inkubasi pada 10 ml media PDB selama 7 hari pada suhu 30°C. Selanjutnya kultur *R. pickettii* konsentrasi 10 mL hasil preinkubasi selama 30 jam pada media NB dengan variasi waktu penambahan 0, 1, 3, dan 5 hari ditambahkan ke dalam kultur. Tiap labu ditambahkan oksigen dengan cara mengalirinya melalui selang oksigen yang dimasukkan ke dalam kultur, apabila media kultur sudah jenuh yang ditandai dengan dinginya permukaan erlemeyer maka penambahan oksigen dihentikan. Kemudian kultur ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambahkan DDT dan tidak dilakukan penambahan bakteri. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai kontrol positif.

3.2.10 Perolehan Ulang (Recovery) DDT dan Identifikasi Metabolit Produk

Sebanyak 20 mL metanol dan 50 μ L piren 5 mM ditambahkan ke dalam kultur hasil inkubasi. Sampel dicuci dengan 10 mL aseton. Kultur disaring menggunakan kertas whatman diameter 9. Filtrat dievaporasi pada suhu 40°C hingga aseton dan metanol menguap semua. Filtrat yang tidak menguap dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu ditambahkan 50 ml aquades dan 50 mL *n*-heksana dan dikocok selama 10 menit. Fasa organik dipisahkan sedangkan fasa air diekstrak kembali sebanyak 2 kali. Fasa organik yang terkumpul dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi Na₂SO₄ anhidrat, kemudian disaring. Sampel dievaporasi pada suhu 65°C hingga tersisa sekitar 1 mL, selanjutnya sampel dianalisis menggunakan GC/MS dengan kondisi suhu inlet 250°C dan laju alir mL/menit, suhu kolom pertama 80°C ditahan selama 3 menit, kemudian naik selama 12 menit sampai pada suhu 320°C, ketika mencapai suhu 320°C ditahan

selama 2 menit, kemudian turun sampai suhu 300°C dan ditahan selama 5 menit. Sisa sampel dievaporasi kembali hingga kering dan ditambah 1 mL metanol. Residu (sampel) dihomogenkan dengan *ultrasonic cleaner*, kemudian dianalisis menggunakan HPLC, kondisi yang digunakan adalah isokratik dengan fasa gerak 80% asetonitril dan 20% air, serta suhu kolom yang digunakan yaitu 45°C.

3.2.11 Penentuan Jalur Degradasi

Penentuan jalur degradasi dilakukan dengan mengulangi metode pengaruh penambahan bakteri terhadap biodegradasi DDT oleh *G. trabeum* namun substrat DDT diganti dengan substrat metabolit produk komersial yaitu DDD sesuai dengan metabolit produk yang dihasilkan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Regenerasi Jamur *Gloeophyllum trabeum*

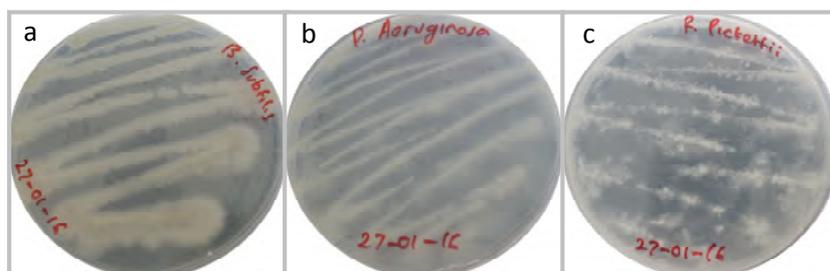
Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur pelapuk coklat dari spesies *G. trabeum*. Galur jamur ini diperoleh dari koleksi jamur Laboratorium Kimia Mikroorganisme Jurusan Kimia FMIPA ITS. *G. trabeum* merupakan jamur pelapuk coklat yang menghasilkan hidrogen peroksida ekstraseluler (H_2O_2) dan asam oksalat ($H_2C_2O_2$) dalam proses degradasinya (Farn dkk., 1999; Kerem dkk., 1999; Jensen dkk., 2001; Newcombe dkk., 2002; Kelley dkk., 2003; Kaneko dkk., 2004; Daniel dkk., 2007; Purnomo dkk., 2008; Arantes dkk., 2012). Jamur ini diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium agar steril (PDA). Pemilihan PDA sebagai media inokulasi karena PDA terdiri dari ekstrak kentang 200 gram, dektrosa 20 gram, serta agar 15 gram. Karbohidrat di dalam ekstrak kentang dan dektrosa digunakan jamur sebagai sumber karbon dan energi dalam pertumbuhan sel. Karbon dibutuhkan jamur dalam jumlah yang sangat besar dari pada elemen lain, sedangkan nitrogen digunakan untuk sintesis asam amino, protein, dan asam nukleik yang dibutuhkan untuk membangun protoplasma. Jamur menggunakan Nitrogen untuk membentuk protein dan asam nukleik dan asam amino yang digunakan untuk membentuk kitin pada dinding sel jamur. Vitamin merupakan senyawa organik yang berfungsi sebagai koenzim atau bagian konsituen dari koenzim yang digunakan sebagai katalisator reaksi tertentu, berikut ini beberapa vitamin yang dibutuhkan jamur diantaranya vitamin B dan asam p-aminobenzoik (Moore dan Landecker, 1996). Selain vitamin, jamur juga menggunakan unsur-unsur mineral yang terdapat pada ekstrak kentang seperti K, P, Ca, Mg, Zn dan Cu berfungsi untuk mendorong pertumbuhannya. Banyak proses metabolisme jamur memanfaatkan Mg dan Zn sebagai kofaktor dan sangat berperan penting dalam menstabilkan struktur protein jamur (Hanson, 2008). Kultur diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari sampai seluruh permukaan medium tertutupi miselium seperti yang terlihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 *G. trabeum*.

4.2 Regenerasi Bakteri

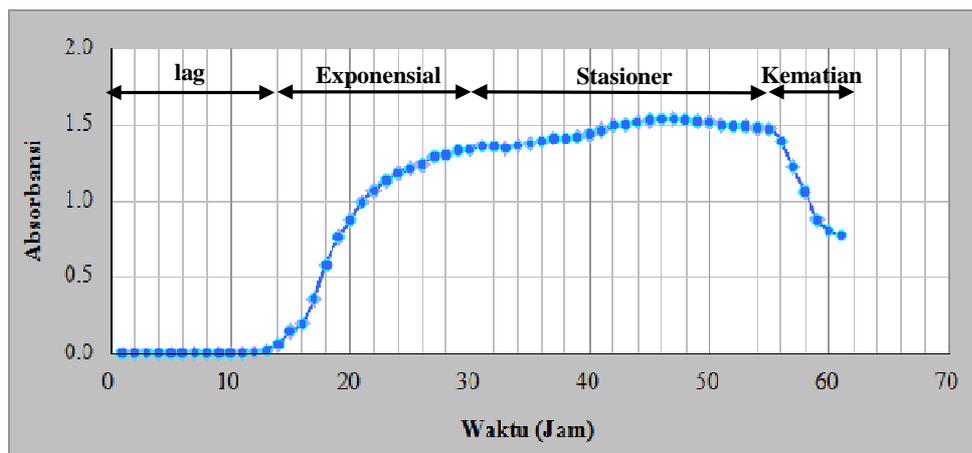
Bakteri-bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *B. subtilis*, *P. aeruginosa* dan *R. pickettii*. Bakteri-bakteri tersebut diperoleh dari koleksi bakteri Laboratorium Kimia Mikroorganisme Jurusan Kimia FMIPA ITS. Ketiga bakteri ini diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium agar NA. Pemilihan NA sebagai media tanam bakteri karena mengandung pepton, ekstrak daging, NaCl dan agar. Ekstrak daging yang terkandung dalam NA berfungsi sebagai zat hara yang terdiri atas karbohidrat yang digunakan bakteri sebagai sumber karbon dan energi, protein digunakan bakteri sebagai sumber nitrogen yang membentuk asam amino, vitamin yang berfungsi sebagai koenzim atau bagian konsituen dari koenzim yang digunakan sebagai katalisator reaksi tertentu dan garam mineral. Pepton yang terkandung dalam NA berfungsi sebagai sumber nitrogen yang digunakan untuk sintesis asam amino. NaCl berfungsi sebagai penyedia elemen mikro berupa natrium. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 24 jam sampai membentuk koloni seperti yang terlihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Kultur bakteri a) *B. subtilis*, b) *P. aeruginosa*, dan c) *R. pickettii*.

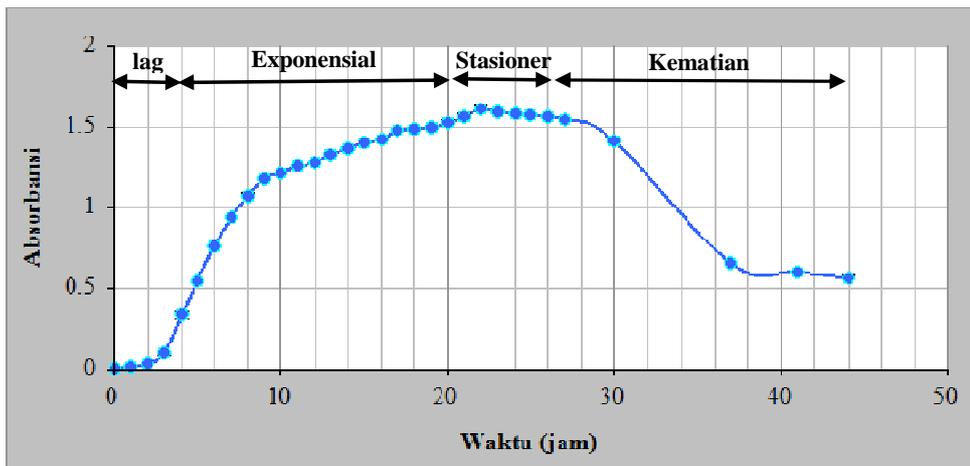
4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk ketiga jenis bakteri yang telah diregenerasi. Satu ose masing-masing bakteri (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, dan *R. pickettii*) hasil regenerasi diinokulasikan ke dalam 10 ml NB. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 24 jam dan dikocok dengan kecepatan 180 rpm. Pengocokan bertujuan agar pertumbuhan bakteri tersebar merata dalam medium. Sebanyak 1 ml kultur dimasukkan ke dalam medium NB dan diukur secara turbidimetri atau optical density (OD) pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) dengan spektrofotometer UV-Vis tiap 1 jam sekali. Penggunaan panjang gelombang 600 nm didasarkan pada pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Kurva pertumbuhan dibuat dengan absorbansi sebagai fungsi waktu. Apabila biakan telah mencapai fase kematian yang ditandai dengan adanya penurunan absorbansi, maka pengukuran dihentikan.



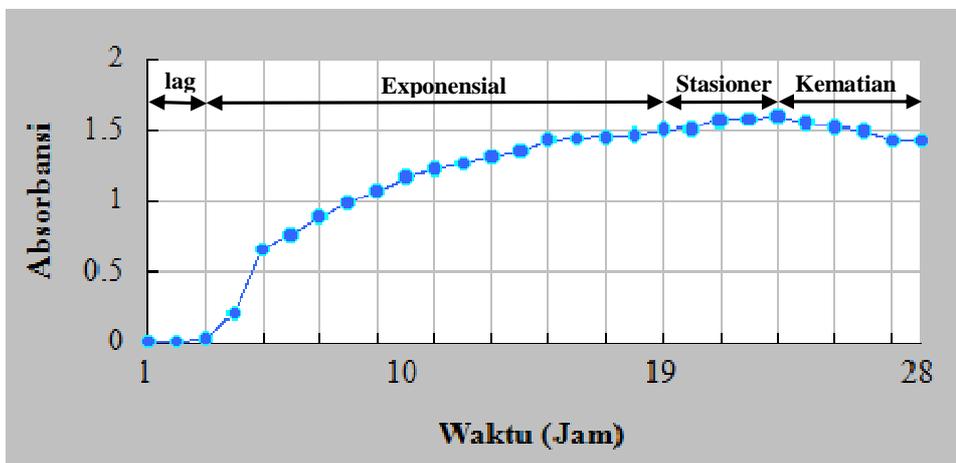
Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan *R. pickettii*.

Berdasarkan Gambar 4.3 menunjukkan bahwa *R. pickettii* mengalami 4 fase dalam perkembangannya, yaitu fase lag pada 0-14 jam inkubasi, fase eksponensial pada 14-29 jam inkubasi, fase stasioner pada 29-54 jam inkubasi, dan mulai pada fase kematian sekitar 54-61 jam inkubasi. Dari hasil tersebut dapat ditentukan bahwa waktu untuk memanen bakteri *R. pickettii* dilakukan ketika peralihan antara fase eksponensial dengan fase stasioner, yaitu setelah 30 jam masa inkubasi.



Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan *P. aeruginosa*.

Berdasarkan Gambar 4.4 menunjukkan bahwa *P. aeruginosa* mengalami 4 fase dalam perkembangannya, yaitu fase lag pada 0-3 jam inkubasi, fase eksponensial pada jam ke 3-20, fase stasioner pada 20-26 dan mulai pada fase kematian sekitar 26-44. Dari hasil tersebut dapat ditentukan bahwa waktu untuk memanen bakteri *P. aeruginosa* dilakukan ketika peralihan antara fase eksponensial dengan fase stasioner, yaitu setelah 21 jam masa inkubasi.



Gambar 4.5 Kurva pertumbuhan *B. subtilis*.

Berdasarkan Gambar 4.5 menunjukkan bahwa *B. subtilis* mengalami 4 fasa pada perkembangannya. Fase lag pada 0-3 jam, fase eksponensial pada 3-19 jam, fase stasioner pada 19-23 jam dan fase kematian pada 23-27 jam. Dari hasil tersebut dapat ditentukan bahwa waktu untuk memanen bakteri *B. subtilis* dilakukan ketika peralihan antara fase eksponensial dengan fase stasioner, yaitu

setelah 20 jam masa inkubasi. Pemilihan waktu panen yaitu pada saat fase stasioner dimana pada fase tersebut jumlah sel bakteri relatif tetap dan produksi metabolit sekunder mencapai titik optimal.

4.4 Pembuatan Kurva Standar DDT

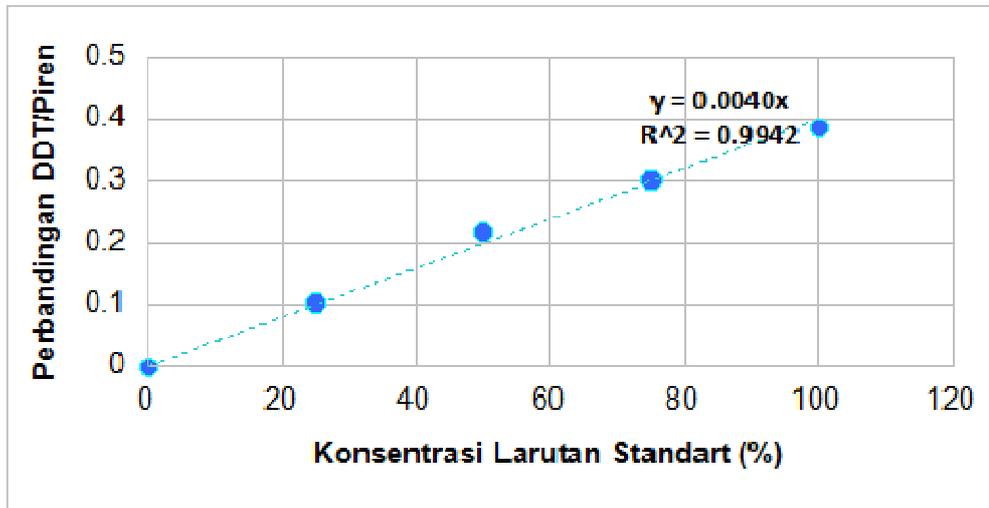
Larutan DDT dibuat konsentrasi sebesar 25, 50, 75, 100% (100% = 0,25 μ mol DDT yang berasal dari 50 μ L DDT 5 mM). Sebanyak 50 μ L piren 5 mM ditambahkan ke dalam masing-masing larutan DDT sebagai internal standar. Internal standar digunakan sebagai pembanding sampel yang akan tentukan konsentrasinya. Internal standar yang digunakan adalah piren, piren merupakan senyawa yang mempunyai sifat yang hampir sama dengan senyawa yang dianalisis yaitu DDT. Sampel dianalisa menggunakan HPLC dengan fasa gerak metanol 80%. Kurva pertumbuhan dibuat dengan nilai perbandingan luas area puncak DDT/piren sebagai fungsi konsentrasi DDT. Hasil analisis ditunjukkan pada Tabel 4. di bawah ini.

Tabel 4.1 Data kurva standar DDT.

Konsentrasi (%)	Luas Puncak DDT	Luas Puncak Piren	Perbandingan Luas Puncak DDT/Piren
0	0	0	0
25	78914.87	8212.815	0.104 \pm 0.005
50	79824.905	17472.955	0.219 \pm 0.001
75	78336.445	23601.56	0.301 \pm 0.003
100	75547.93	29219.505	0.387 \pm 0.002

Dari Tabel 4.1 dapat dibuat grafik seperti ditunjukkan pada Gambar 4.6 sehingga diperoleh persamaan regresi $y = 0.0040x$, dimana x merupakan konsentrasi DDT dan y merupakan perbandingan luas puncak DDT/Piren. Persamaan regresi linier tersebut digunakan sebagai acuan untuk menentukan konsentrasi DDT yang terdapat dalam sampel. Hubungan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/Piren dapat diketahui dari koefisien korelasi (r). Koefisien korelasi merupakan angka yang

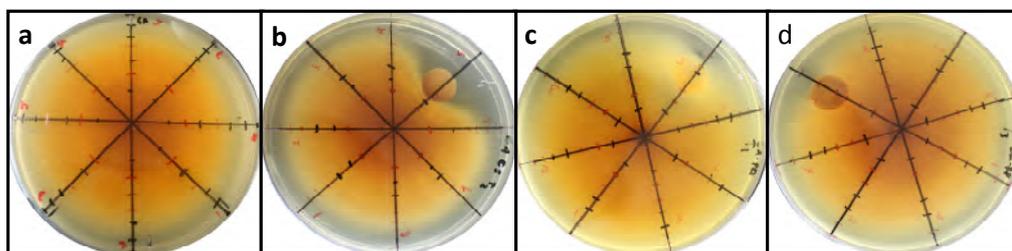
menunjukkan hubungan antara dua variabel atau lebih. Hubungan antar variabel dapat bersifat positif dan negatif.



Gambar 4.6 Kurva standart DDT.

4.5 Pengaruh bakteri pada pertumbuhan *G. trabeum*

Jamur *G. trabeum* diinokulasikan menggunakan loop berukuran 5 mm ke dalam cawan petri yang berisi medium agar steril PDA. Kemudian bakteri ditambahkan dengan jarak 4 cm dari *G. trabeum*, hal ini bertujuan untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara bakteri dan jamur. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 2 hari, hal ini bertujuan untuk mengkondisikan jamur tumbuh terlebih dahulu. Setelah itu dilakukan pengukuran pertumbuhan miselium setiap hari sampai seluruh permukaan medium tertutupi miselium. Untuk kontrol perlakuan sama tanpa penambahan bakteri.



Gambar 4.7 Miselium jamur setelah 10 hari masa inkubasi. a) kontrol (*G. trabeum* tanpa penambahan bakteri), b) *G. trabeum* dengan *B. subtilis*, c) *G. trabeum* dengan *P. aeruginosa*, d) *G. trabeum* dengan *R. pickettii*.

Berdasarkan Gambar 4.7 menunjukkan bahwa *B. subtilis* menghambat pertumbuhan miselium *G. trabeum* dengan membandingkan pertumbuhan miselium kontrol yang menunjukkan tidak adanya penghambatan. *B. subtilis* mampu menghambat pertumbuhan miselium *G. trabeum* dikarenakan *B. subtilis* mampu menghasilkan beberapa peptida yang berperan sebagai antibiotik dan antifungi, seperti subtilin, aterimin, basitrasin, subtilosin, mikobasillin, subsporin, ituirin, serexin, surfactin, basillomicin, basillisin, asam 10 sianida, fengimisin, dan basillsosin (Fiddaman dan Rosall, 1993; Joshi dkk., 2008; Pratama, 2013). Selain itu *B. subtilis* juga menghasilkan enzim degradatif makromolekul yang bisa menghancurkan dinding sel jamur, seperti protease (intraseluler) dan beberapa enzim ekstraseluler yang disekresikan pada medium seperti levansukrase, glukonase, amilase, xilanase, kitinase, dan protease (Pratama, 2013).

Pertumbuhan miselium *G. trabeum* tidak mengalami penghambatan adanya bakteri *P. aeruginosa* dan *R. pickettii*, hal tersebut dibuktikan dengan terjadinya kontak antara miselium *G. trabeum* dengan koloni bakteri. Beberapa penelitian melaporkan bahwa bakteri *P. aeruginosa* dan *R. pickettii* dapat meningkatkan pertumbuhan jamur. Kim dkk. (2008) melaporkan bahwa *Pseudomonas* sp. P7014 dapat meningkatkan kecepatan pertumbuhan miselium jamur *Pleurotus eryngii*. Kataoka dan Futai (2009) melaporkan bahwa *Pseudomonas* sp. tidak memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan miselium *S. granulatus* dan *R. pickettii* meningkatkan pertumbuhan miselium *S. granulatus* tanpa kontak sel antara jamur dan bakteri.

4.6 Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum*

Kultur *G. trabeum* diinokulasikan menggunakan jarum ose (diameter 1 cm) ke dalam erlenmeyer berisi 10 mL medium PDB. Pemilihan media PDB sebagai media cair dalam penelitian ini berfungsi sebagai sumber karbon dan energi yang digunakan jamur untuk mendukung pertumbuhannya. Kultur di pre-inkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C, suhu tersebut merupakan suhu optimum jamur dalam mendegradasi (Griffin, 1994). Setelah masa pre-inkubasi, masing-masing kultur ditambah 50 µL dari DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25

$\mu\text{mol DDT/labu}$). DDT merupakan senyawa yang bersifat non polar dan tidak larut air akan tetapi larut dalam lemak. DMSO merupakan pelarut aprotik yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar, sehingga DMSO akan membantu meningkatkan kelarutan DDT dalam air. Kemudian setiap labu ditambahkan oksigen dengan cara mengalirinya melalui selang oksigen yang dimasukkan ke dalam kultur, apabila media kultur sudah jenuh yang ditandai dengan dinginnya permukaan bagian bawah erlemeyer, maka penambahan oksigen dihentikan.

Penambahan oksigen dalam kultur bertujuan untuk menstimulasi pertumbuhan jamur atau yang dikenal dengan biostimulasi. *G. trabeum* merupakan jamur yang bersifat aerobik sehingga membutuhkan oksigen dalam proses respirasinya sehingga dapat meningkatkan proses degradasinya (Atlas dan Philp, 2005; Plaza dkk., 2007). Kemudian kultur ditutup sumbat kaca serta diselotip untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme lain. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C . Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT. Fungsi kontrol adalah untuk memastikan bahwa penurunan DDT dalam kultur dari proses degradasi oleh *G. trabeum*, bukan karena hal lain diluar proses degradasi.

Setelah proses degradasi selama 7 hari selesai, dilakukan proses *recovery*, dimana *recovery* bertujuan untuk mengetahui jumlah DDT yang terdegradasi dengan cara membandingkan luas puncak DDT dan piren. Sebanyak 20 mL metanol dan 50 μL piren 5 mM ditambahkan ke dalam kultur hasil inkubasi, piren ditambahkan sebagai internal standart, sedangkan metanol digunakan untuk mematikan kultur dengan cara merubah komposisi lipid yang nantinya akan berpengaruh pada fluidity membran sehingga mempengaruhi tranportasi zat terlarut, selain itu formaldehida yang dihasilkan oleh metanol mengalami cross-link dengan protein atau molekul lain pada membran sel yang mengakibatkan protein akan mengalami denaturasi (Salakkama dan Webba, 2015). Patterson dan Ricke (2015) melaporkan bahwa metanol diketahui memberikan pengaruh pada

pembentukan dan fungsi membran, komposisi dan sintesis lipid, sintesis protein dan asam nukleas, enzim dan sistem transportasi.

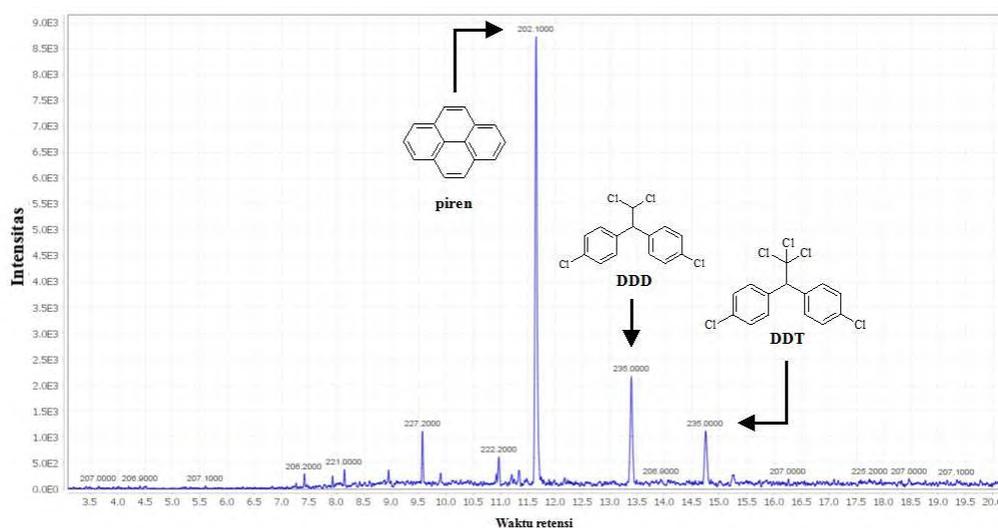
Setelah penambahan metanol dan piren, sampel dicuci dengan 10 mL aseton, hal tersebut bertujuan untuk melarutkan senyawa yang menempel di dinding erlenmeyer karena sifat aseton yang polar aprotik. Selanjutnya, sampel dihomogenkan, homogenisasi yang bertujuan untuk menghancurkan miselium jamur sehingga DDT yang terperangkap di dalam miselium dapat keluar. Kemudian, kultur disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 7 menit, hal ini bertujuan untuk memisahkan antara biomassa jamur dan supernatan dengan menggunakan prinsip pemisahan berdasarkan berat jenis. Setelah disentrifugasi kultur disaring, hal ini bertujuan untuk memisahkan antara biomassa dan supernatan. Kemudian supernatan hasil saring dievaporasi pada suhu 65°C hingga aseton dan metanol menguap semua, karena titik didih metanol 64,7°C dan aseton 56°C.

Filtrat yang tidak menguap dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu ditambahkan 50 ml aquades dan 50 mL *n*-heksana dan dikocok selama 10 menit. Fasa organik dipisahkan sedangkan fasa air diekstrak kembali sebanyak 2 kali. Ekstraksi cair-cair bertujuan untuk memisahkan komponen (solut) dari suatu cairan pembawa (diluen) dengan cara pengontakan menggunakan pelarut lain (solven). Penggunaan pelarut aquades karena air bersifat polar dengan tingkat polaritas tinggi (konstanta dielektrik = 80), densitas 1 g/mL, sedangkan *n*-heksan bersifat non-polar sehingga mampu melarutkan DDT. Fasa organik yang terkumpul dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi Na₂SO₄ anhidrat, kemudian disaring.

Na₂SO₄ anhidrat berfungsi sebagai pengikat molekul air yang masih tersisa dalam fasa organik dengan membentuk air kristal. Selanjutnya sampel dievaporasi pada suhu 40°C hingga tersisa sekitar 3 mL, kemudian sampel dianalisis menggunakan GC/MS dengan kondisi suhu inlent 250°C dan laju alir 3 mL/menit, suhu kolom pertama 80°C dan ditahan selama 3 menit, kemudian naik selama 12 menit sampai suhu mencapai 320°C, ketika suhu kolom 320°C ditahan selama 12 menit, kemudian turun sampai suhu 300°C dan ditahan 5 menit. Sisa sampel

dievaporasi kembali hingga kering dan ditambah 1 mL metanol. Residu (sampel) dihomogenkan dengan *ultrasonic cleaner*, hal ini bertujuan untuk melarutkan DDT yang menempel di dinding labu. Kemudian dianalisis menggunakan HPLC, kondisi yang digunakan adalah isokratik dengan fasa gerak 80% acetonitril dan 20% air MiliQ, serta suhu kolom yang digunakan yaitu 45°C. Hasil analisis menggunakan HPLC menunjukkan bahwa *recovery* DDT kontrol adalah sebesar 96.70%, sedangkan pada *treatment recovery* sebesar 42.17%. Berdasarkan data tersebut, maka *G. trabeum* mampu mendegradasi DDT sebanyak 54.52% selama 7 hari inkubasi.

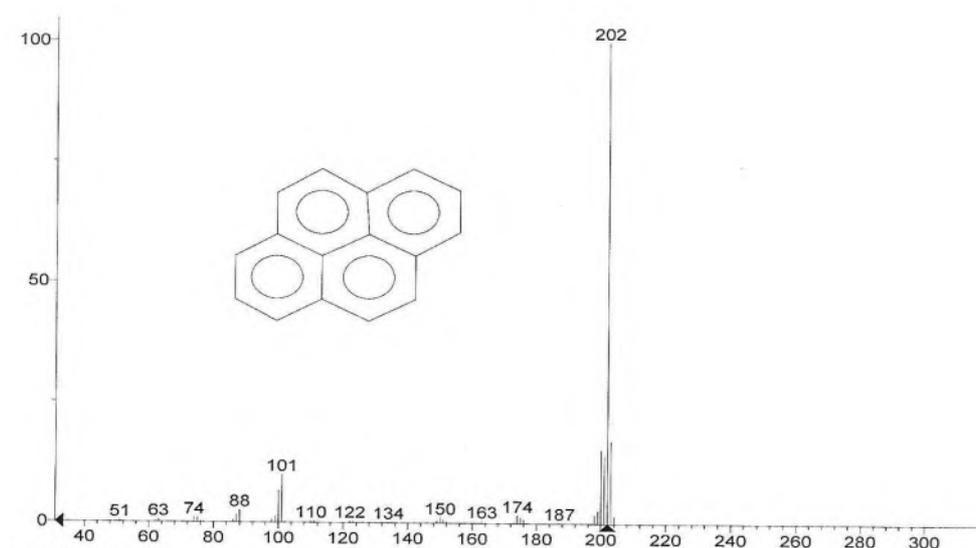
Kromatogram hasil analisis GCMS pada Gambar 4.8 menunjukkan bahwa terdapat tiga puncak dengan waktu retensi yang berbeda-beda. Senyawa piren terdeteksi pada waktu retensi 11.7 menit, DDT pada waktu retensi 14.8 menit dan DDD pada waktu retensi 13.4 menit. Senyawa DDD merupakan metabolit produk hasil degradasi DDT oleh *G. trabeum* selama 7 hari masa inkubasi. Identifikasi senyawa dilakukan berdasarkan spektra MS hasil analisis dengan spektra MS data base. Pencocokan didasarkan pada pola pemecahan pada spektra MS data base dengan pola pemecahan spektra MS hasil analisis.



Gambar 4.8 Kromatogram GC biodegradasi DDT oleh *G. trabeum* selama 7 hari

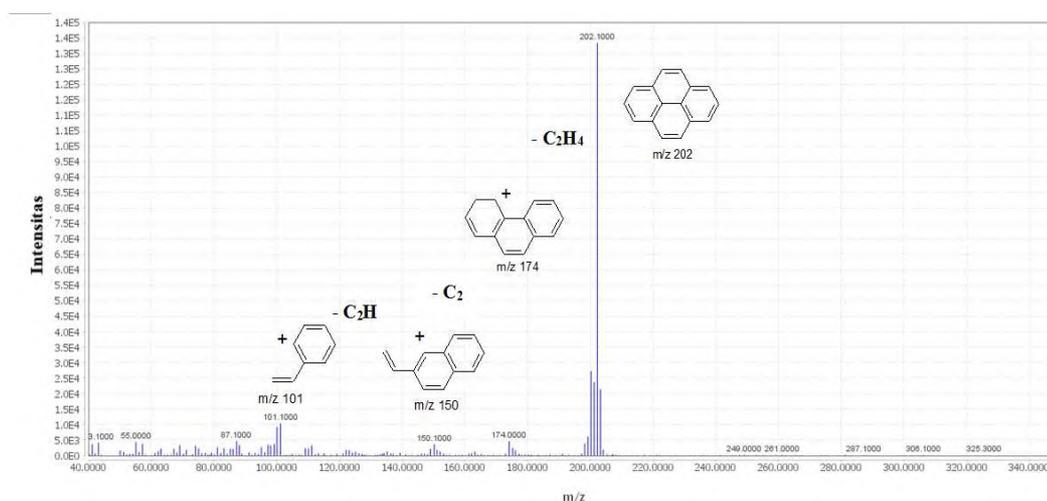
Piren memiliki nilai M^+ sebesar 202. Berikut nilai m/z dari beberapa MS dalam database antara lain: 202 (base peak), 175, 150, dan 101. Gambar 4.9

merupakan spektra MS piren dalam database yang digunakan sebagai pembandingan dengan spektra MS piren hasil analisis sampel, sehingga dapat diketahui tingkat kemiripan serta mengurangi potensi kesalahan dalam identifikasi senyawa.



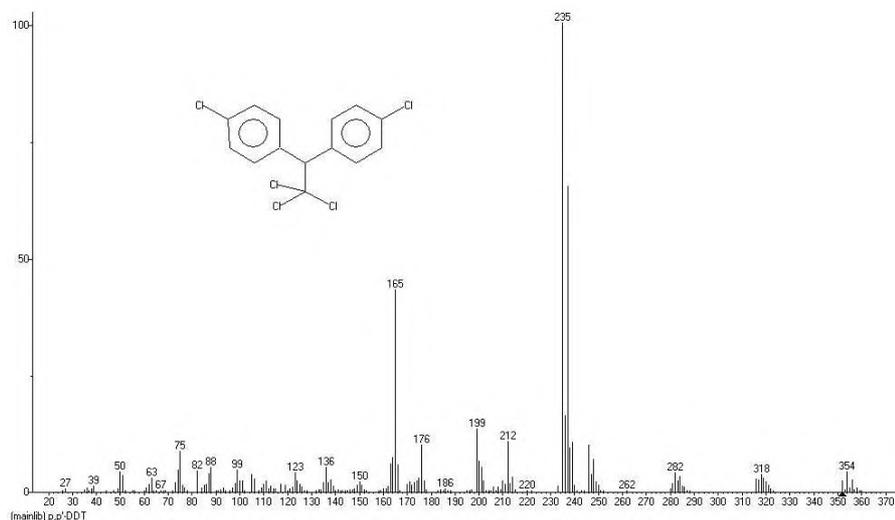
Gambar 4.9 Spektra MS piren database

Berdasarkan hasil analisis, spektra MS piren data base memiliki nilai m/z yang sama dengan spektra MS hasil analisis seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.10. Sehingga senyawa yang keluar pada waktu retensi 11.7 menit merupakan senyawa piren. Berikut ini nilai m/z hasil fragmentasi molekul piren:



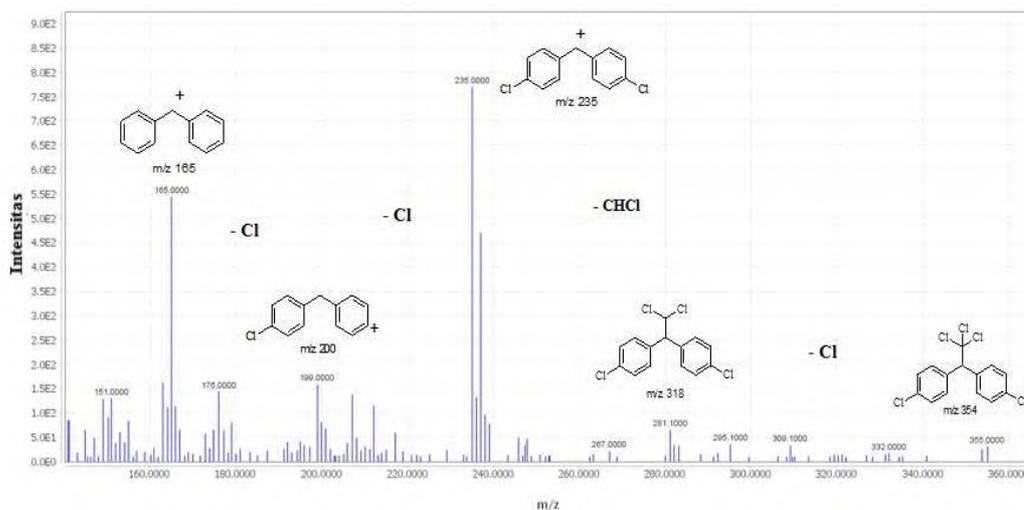
Gambar 4.10 Spektra MS piren biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*

DDT memiliki nilai M^+ sebesar 352. Nilai m/z spektra MS dalam database antara lain: 352, 317, 282, 235 (base peak), dan 165 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.11.



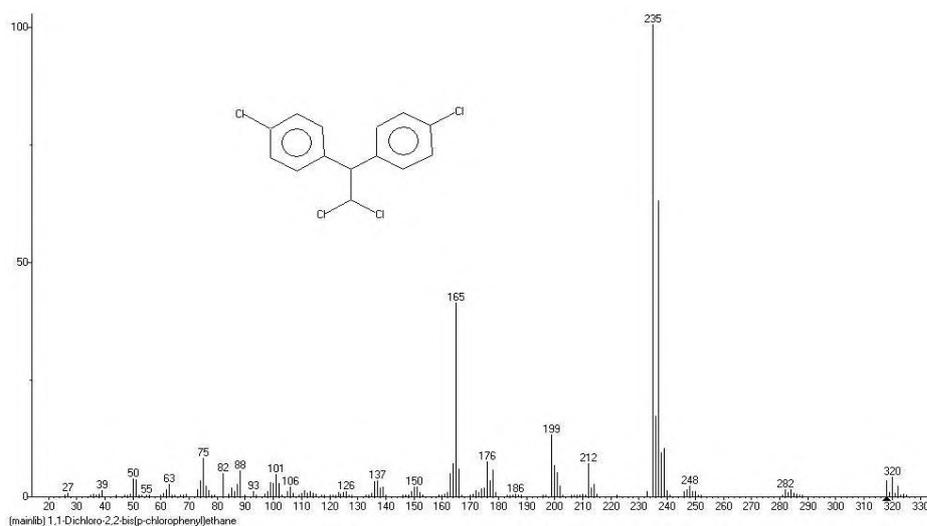
Gambar 4.11 Spektra MS DDT database

Berdasarkan hasil analisis, spektra MS DDT data base memiliki kesamaan dengan nilai m/z spektra MS hasil analisis seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.10. Sehingga senyawa yang keluar pada waktu retensi 14.8 menit merupakan senyawa DDT. Berikut ini nilai m/z hasil fragmentasi senyawa DDT:



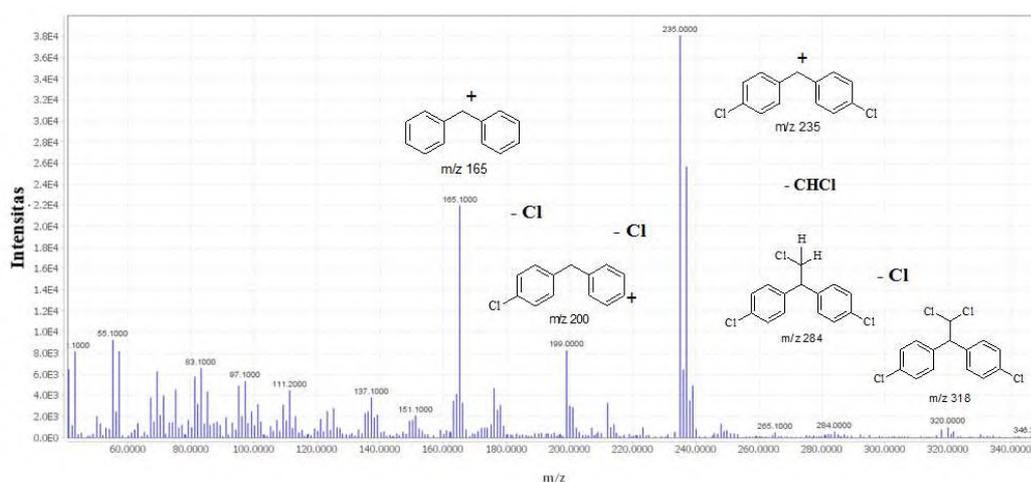
Gambar 4.12 Spektra MS DDT biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*

DDT memiliki nilai M^+ sebesar 218. Berikut nilai m/z dari beberapa MS dalam database antara lain: 320, 325 (base peak), 199, dan 165 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.13 Sehingga senyawa yang keluar pada waktu retensi 13.4 menit merupakan senyawa DDD. Berikut ini nilai m/z hasil fragmentasi senyawa DDD:



Gambar 4.13 Spektra MS DDD database

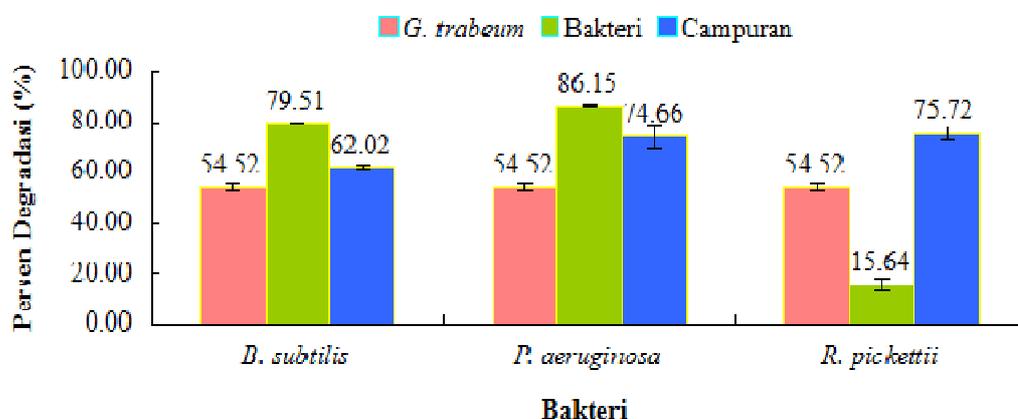
Nilai m/z spektra MS DDD dalam database sama dengan spektra MS DDD hasil analisis antara lain: 320, 235 (base peak), 199, dan 165 seperti yang terlihat pada Gambar 4.14. Berdasarkan hasil spektra MS DDD maka dapat diuraikan berdasarkan fragmentasinya sebagai berikut:



Gambar 4.14 Spektra MS DDD biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*

4.7 Pengaruh Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum* (Screening Bakteri)

Kultur bakteri *B. subtilis* (1 mL $\approx 0.67 \times 10^9$ CFU), *P. aeruginosa* (1 mL $\approx 1.5 \times 10^9$ CFU) dan *R. pickettii* (1 mL $\approx 1.44 \times 10^{13}$ CFU) hasil pre-inkubasi secara berurutan yaitu 20, 21, dan 30 jam dalam media NB ditambahkan sebanyak 5 mL ke dalam kultur jamur hasil pre-inkubasi pada 10 mL media PDB selama 7 hari pada suhu 30°C, masing-masing kultur ditambah 50 μ L DDT 5mM dalam DMSO (konsentrasi akhir 0,25 μ mol DDT/labu). Kemudian PDB ditambahkan ke dalam masing-masing kultur sampai volume total 20 ml. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai kontrol positif. Jenis bakteri dengan kemampuan degradasi terbesar akan digunakan pada proses degradasi DDT. Selanjutnya dilakukan proses *recovery* yang telah dijelaskan pada Sub-Bab 4.6.



Gambar 4.15 Pengaruh penambahan bakteri volume 5 mL terhadap biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*.

Berdasarkan Gambar 4.15 diatas menunjukkan bahwa penambahan bakteri dapat meningkatkan kinerja degradasi DDT oleh *G. trabeum*. Hal tersebut ditunjukkan dengan hasil degradasi penambahan bakteri *B. subtilis*, *P. aeruginosa* dan *R. pickettii* ke dalam kultur *G. trabeum* sebesar 62.02; 74.66; dan 75.72% dibandingkan dengan hasil degradasi *G. trabeum* tanpa penambahan bakteri

sendiri yaitu sebesar 54.52%. Degradasi mengalami peningkatan dikarenakan ketiga bakteri ini menghasilkan biosurfaktan, dimana biosurfaktan yang dihasilkan ketiga bakteri antara lain surfaktin (*B. subtilis*), rhamnolipid (*P. aeruginosa* dan *R. pickettii*) sebagai agen pengemulsi yang meningkatkan kelarutan DDT dalam media kultur, sehingga ketersediaan DDT untuk didegradasi semakin meningkat. Dugaan ini diperkuat dari beberapa penelitian yang melaporkan bahwa biosurfaktan yaitu rhamnolipid yang dihasilkan *P. aeruginosa* dalam kultur murni dapat meningkatkan kecepatan biodegradasi hidrokarbon (Folch dkk., 1957; Hisatsuka dkk., 1971; Itoh dkk., 1972; Koch dkk., 1991; Zhang dkk., 1992; Zhang dkk., 1994; Shreve dkk., 1995; Zhang dkk., 1997).

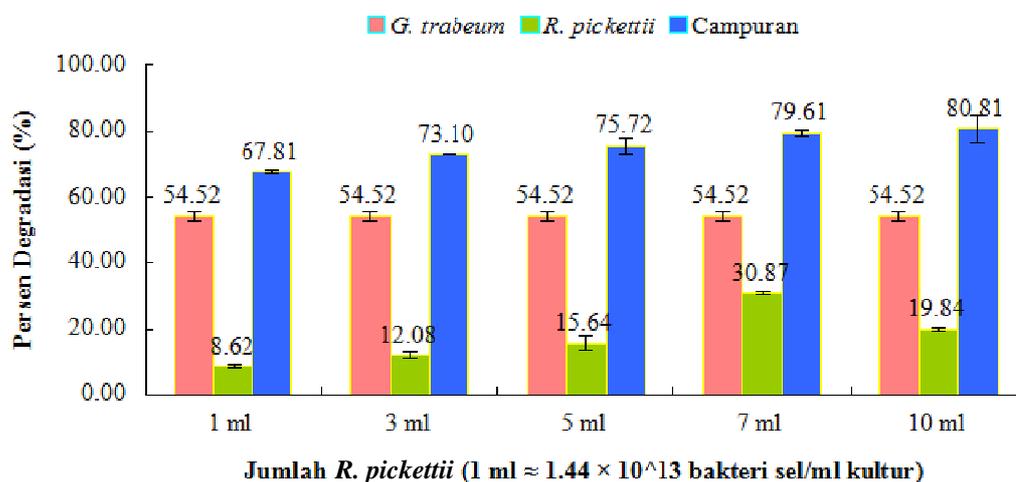
Penambahan *B. subtilis* ke dalam kultur *G. trabeum* menunjukkan hasil degradasi paling rendah diantara yang lainnya, hal ini dikarenakan bahwa *B. subtilis* menghambat pertumbuhan jamur *G. trabeum* dibuktikan pada gambar 4.3 (b) yang menunjukkan bahwa miselium *G. trabeum* dalam media PDA terhambat pertumbuhannya adanya *B. subtilis*. Bakteri ini menghasilkan senyawa antifungal yang dapat menghambat pertumbuhan jamur. Fiddaman dan Rosall, (1992) melaporkan bahwa *B. subtilis* menghasilkan senyawa volatil yaitu antifungal terhadap jamur *Rhizoctonia solani* dan *Pythium ultimum*. Selain itu *B. subtilis* menghambat pertumbuhan jamur *P. palmivora* dikarenakan bakteri ini menghasilkan beberapa peptida yang berperan sebagai antibiotik dan antifungi, seperti: subtilin, aterimin, basitrasin, subtilosin, mikobasillin, subsporin, ituirin, serexin, surfactin, basillomicin, basillisin, asam 10 sianida, fengimisin, dan basillsosin. *B. subtilis* merupakan bakteri patogen yang menghasilkan enzim degradatif makromolekul yang bisa menghancurkan dinding sel jamur, seperti protease (intraseluler) dan beberapa enzim ekstraseluler yang disekresikan pada medium seperti levansukrase, glukonase, amilase, xilanase, kitinase, dan protease (Mille-Lindblom, 2005; Pratama, 2013).

Penambahan *P. aeruginosa* dan *R. picketti* ke dalam kultur *G. trabeum* menunjukkan degradasi tertinggi dengan masing-masing yaitu 74.66 dan 75.72%. Ditinjau dari hasil kinerja bakteri, degradasi campuran *G. trabeum* dan *P. aeruginosa* mengalami penurunan dibandingkan kinerja degradasi *P. aeruginosa*

sendiri, namun terjadi peningkatan signifikan pada campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii* dibandingkan kinerja degradasi *R. pickettii* sendiri. Hal ini mengindikasikan bahwa *R. pickettii* dapat bersinergis dengan *G. trabeum* diperkuat dengan yang ditunjukkan pada Gambar 4.3 (d) bahwa pertumbuhan miselium *G. trabeum* tidak mengalami penghambatan dengan adanya bakteri *R. pickettii*. Sinergis merupakan interaksi yang terjadi antara jamur dan bakteri yang memberikan pengaruh saling menguntungkan dari kedua belah pihak (Mille-Lindblom, 2005).

4.8 Pengaruh Jumlah Penambahan *R. pickettii* terhadap Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum* (Variasi Jumlah Bakteri)

Kultur jamur hasil pre-inkubasi sebanyak 10 mL media PDB selama 7 hari pada suhu 30°C, ditambah dengan kultur bakteri *R. pickettii* dengan variasi jumlah bakteri 1, 3, 5, 7, dan 10 mL. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai kontrol positif. Jumlah bakteri yang menghasilkan kemampuan degradasi DDT terbesar selanjutnya dipilih untuk digunakan dalam proses degradasi selanjutnya.



Gambar 4.16 Pengaruh variasi jumlah penambahan *R. pickettii* terhadap biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*

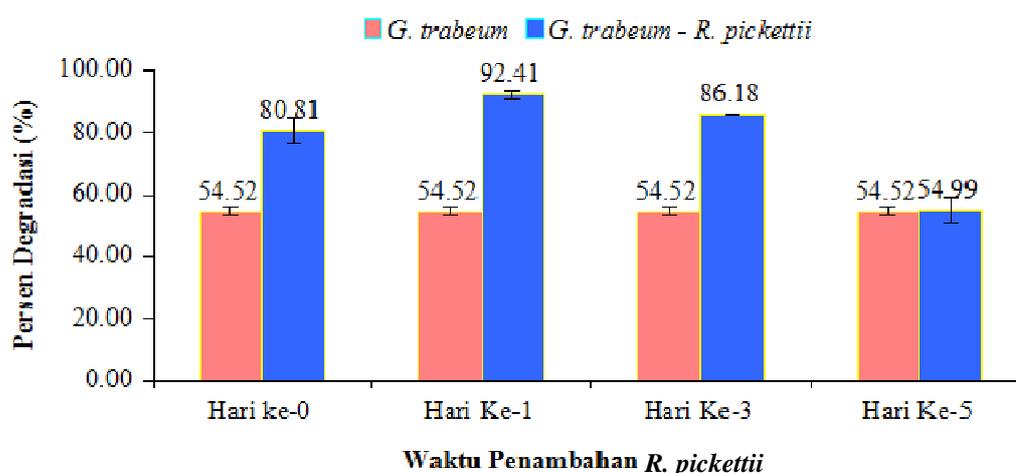
Berdasarkan Gambar 4.16 diatas menunjukkan bahwa variasi jumlah penambahan *R. pickettii* yang ditambahkan ke dalam kultur *G. trabeum* memiliki pengaruh terhadap degradasi DDT. Peningkatan Jumlah degradasi DDT dalam campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii* mencapai 80.81% pada penambahan bakteri sebanyak 10 ml, hal tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak bakteri yang ditambahkan semakin besar biosurfaktan yang dihasilkan menyebabkan jumlah kelarutan DDT dalam kultur *G. trabeum* meningkat sehingga jumlah DDT yang terdegradasi semakin banyak dan proses degradasi menjadi lebih cepat. Sinergitas terlihat dalam campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii*, dimana hasil degradasi campuran mengalami peningkatan dibandingkan kinerja dari masing-masing pendegradasi. Penambahan *R. pickettii* sebanyak 10 mL digunakan pada uji pengaruh waktu penambahan *R. pickettii* terhadap biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*.

4.9 Pengaruh Waktu Penambahan *R. pickettii* terhadap Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum* (Variasi Waktu Penambahan Bakteri)

Sebanyak 50 µL DDT 5 mM dalam pelarut DMSO (konsentrasi akhir 0,25 µmol DDT/labu) ditambahkan ke dalam kultur jamur hasil pre-inkubasi pada 10 ml media PDB selama 7 hari pada suhu 30°C. Selanjutnya kultur bakteri *R. pickettii* 10 mL hasil pre-inkubasi 30 jam pada media NB dengan variasi waktu penambahan 0, 1, 3, dan 5 hari ditambahkan kedalam kultur. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai kontrol positif. Hasil analisa variasi waktu penambahan *R. pickettii* terhadap degradasi DDT oleh *G. trabeum* ditunjukkan pada Gambar 4.11.

Berdasarkan Gambar 4.17 menunjukan bahwa waktu penambahan *R. pickettii* dalam kultur *G. trabeum* memiliki pengaruh terhadap degradasi DDT. Kemampuan kinerja degradasi DDT oleh *G. trabeum* meningkat pada saat penambahan *R. pickettii* pada hari ke-1 dan ke-3. Peningkatan maksimum terjadi pada saat penambahan hari ke-1 sebesar 11.60%, sedangkan peningkatan mengalami penurunan pada saat penambahan hari ke-3 dengan kenaikan sebesar 5.37% dibandingkan dengan penambahan pada saat hari ke-0. Pada hari ke-5

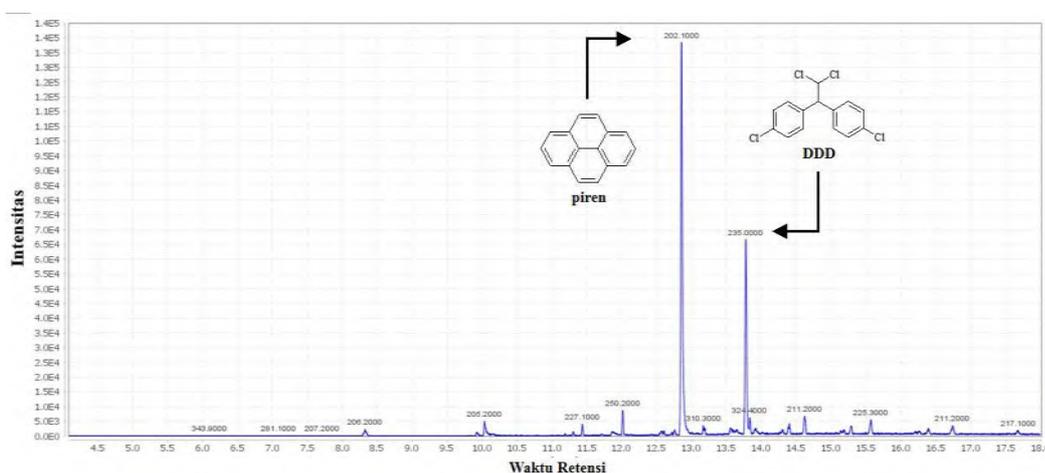
kemampuan degradasi DDT oleh campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii* menurun sebesar 25.82% dibandingkan penambahan pada saat hari ke-0, hasil ini mendekati kemampuan degradasi *G. trabeum* tanpa penambahan bakteri sebesar 54.52%. Pemberian selang waktu 1 hari dan 3 hari dapat memberikan kesempatan untuk *G. trabeum* dalam menghasilkan Fenton reaksi terlebih dahulu, sehingga pada saat bakteri ditambahkan kelarutan DDT meningkat yang menyebabkan degradasi DDT dengan Fenton reaksi yang dihasilkan oleh *G. trabeum* meningkat.



Gambar 4.17 Pengaruh waktu penambahan *R. pickettii* terhadap biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*

Namun pada saat penambahan pada hari ke-5 kemampuan degradasi campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii* menurun sebesar 54.99%, selain itu jika dibandingkan dengan kemampuan degradasi *G. trabeum* tanpa penambahan *R. pickettii* tidak menunjukkan perbedaan secara signifikan selisihnya hanya sebesar 0.47%. Hal ini mengindikasikan bahwa biosurfaktan yang dihasilkan oleh *R. pickettii* pada penambahan hari ke-5 belum maksimal sehingga tidak memberikan pengaruh terhadap kelarutan DDT dalam kultur dan kemampuan kinerja degradasi DDT oleh *G. trabeum*. Mille-Lindblom, (2005) melaporkan bahwa dalam suatu kultur campuran antara bakteri dan jamur, jamur sangat banyak berperan dalam proses degradasinya dibandingkan bakteri, karena kemampuan jamur dalam mendegradasi molekul organik, sehingga bakteri akan melanjutkan sisanya, hal tersebut di buktikan dengan tingginya jumlah enzim polisakarida di dalam bakteri.

Hasil analisis kromatogram GC Gambar 4.18. menunjukkan bahwa terdapat dua puncak dengan waktu retensi berbeda yaitu 10.367 dan 13.917 menit. Identifikasi senyawa dilakukan berdasarkan hasil spektra MS dari masing-masing senyawa yang ada pada kromatogram dengan spektra data base. Selanjutnya, masing-masing senyawa dilakukan pencocokan berdasarkan fragmen-fragmen pada spektra MS data base dengan spektra MS hasil analisis seperti yang telah dijelaskan pada Sub-Bab 6. Berdasarkan hasil analisis, piren keluar pada waktu retensi 10.367 menit dan DDD keluar pada waktu retensi 13.917 menit. Senyawa DDD merupakan metabolit produk yang dihasilkan oleh campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii*.

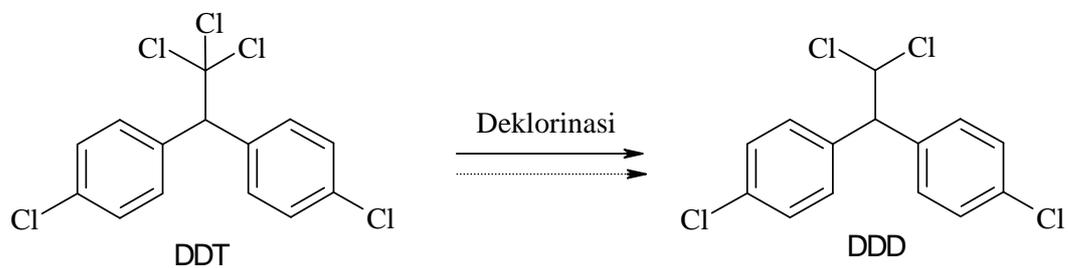


Gambar 4.18 Kromatogram GC campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii*

4.10 Penentuan Jalur Degradasi

Penentuan jalur degradasi dilakukan dengan mengulangi metode pengaruh penambahan *R. pickettii* terhadap biodegradasi DDT oleh *G. trabeum* namun substrat DDT diganti dengan substrat metabolit produk komersial yaitu DDD sesuai dengan metabolit produk yang dihasilkan degradasi sebelumnya. Berdasarkan hasil degradasi DDD oleh campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii* yaitu senyawa DDD tidak mengalami degradasi menjadi senyawa metabolit yang lain, sehingga diperoleh kesimpulan bahwa senyawa DDD merupakan metabolit produk yang dihasilkan oleh campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii* melalui reaksi deklorinasi. Berikut ini jalur degradasi DDT oleh campuran *G. trabeum* dan *R.*

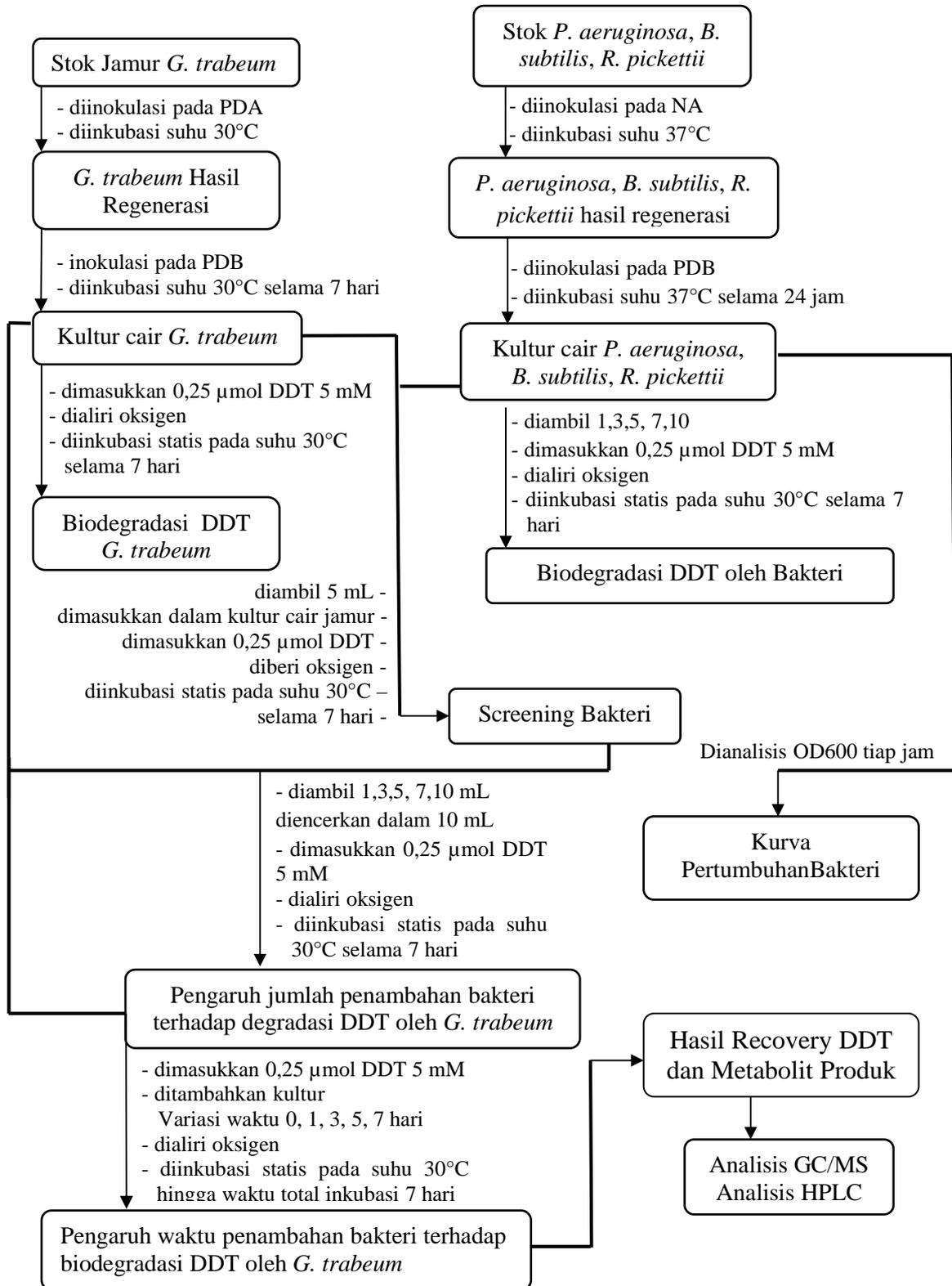
pickettii yang diusulkan seperti yang terlihat pada Gambar 4.19. Anak panah putus-putus merupakan jalur degradasi DDT oleh *G. trabeum*.



Gambar 4.19 Jalur Degradasi DDT oleh campuran *G. trabeum* dan *R. pickettii* yang diusulkan.

LAMPIRAN

A. SKEMA KERJA



B. PERHITUNGAN

1. Pembuatan larutan DDT 5 mM dalam 50 ml DMSO

$$\begin{aligned}n &= M \cdot V \\ &= 5 \times 10^{-3} \text{ M} \cdot 0,05 \text{ L} \\ &= 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa} &= n \cdot M_r \\ &= 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot 354,49 \text{ g/mol} \\ &= 0,0886225 \text{ g DDT (teori)}\end{aligned}$$

Massa yang ditimbang

$$\text{DDT} = 0.0905 \text{ gram}$$

$$n = \text{massa}/M_r$$

$$n = 0.0905 \text{ gram} / 354,49 \text{ g/mol}$$

$$= 2,55 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

2. Pembuatan larutan piren 5 mM dalam 50 ml DMSO

$$\begin{aligned}n &= M \cdot V \\ &= 5 \times 10^{-3} \text{ M} \cdot 0,05 \text{ L} \\ &= 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa} &= n \cdot M_r \\ &= 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot 202,25 \text{ g/mol} \\ &= 0,0505625 \text{ g Piren (teori)}\end{aligned}$$

Massa yang ditimbang

$$\text{Piren} = 0.0504 \text{ gram}$$

$$n = \text{massa}/M_r$$

$$n = 0.0504 \text{ gram} / 202,25 \text{ g/mol}$$

$$= 2,49 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

3. Contoh Perhitungan Persen *Recovery*

Data analisis sampel kontrol (*G. trabeum*)

Luas Puncak Piren	Luas Puncak DDT	Perbandingan Luas Puncak DDT/Piren	<i>Recovery</i>
76994.95	29698.65	0,39	96,43
74100.91	28740.36	0,39	96,96

*Analisis menggunakan HPLC

Persamaan regresi linear kurva standar DDT

$$\begin{aligned}y &= 0,004 x \\ 0,39 &= 0,004 x \\ x &= \frac{0,39}{0,004}\end{aligned}$$

Dimana : y = Perbandingan luas area puncak DDT/piren
x = Persen *recovery*

$$x = 97,5 \%$$

C. DATA ANALISIS SAMPEL

Tabel 1. Data analisis sampel *G. trabeum*

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	8150.39	1344.16	0.16	41.23	42.17
T2	8240.01	1421.06	0.17	43.11	

Tabel 2. Data analisis sampel dengan penambahan *R. pickettii* 1 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	645110	228464	0.35	88.54	88.07
T2	603386	211455	0.35	87.61	

Tabel 3. Data analisis sampel dengan penambahan *R. pickettii* 3 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	14776.09	4964.6	0.34	84.00	84.62
T2	14919.79	5087.19	0.34	85.24	

Tabel 4. Data analisis sampel dengan penambahan *R. pickettii* 5 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	8210.44	2715.12	0.33	82.67	81.05
T2	8707.32	2766.57	0.32	79.43	

Tabel 5. Data analisis sampel dengan penambahan *R. pickettii* 7 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	8936.46	2366.16	0.26	66.19	65.83
T2	8991.7	2354.26	0.26	65.46	

Tabel 6. Data analisis sampel dengan penambahan *R. pickettii* 10 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	9762.26	3017.55	0.31	77.28	76.85
T2	7937.07	2426.63	0.31	76.43	

Tabel 7. Data analisis sampel variasi penambahan *R. pickettii* 1 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	10219.82	1196.71	0.12	29.27	28.89
T2	5972.56	680.8	0.11	28.50	

Tabel 8. Data analisis sampel variasi penambahan *R. pickettii* 3 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	14255.49	1347.89	0.09	23.64	23.60
T2	6270.72	590.86	0.09	23.56	

Tabel 9. Data analisis sampel variasi penambahan *R. pickettii* 5 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	17173.69	1556.37	0.09	22.66	20.98
T2	14896	1149.65	0.08	19.29	

Tabel 10. Data analisis sampel variasi penambahan *R. pickettii* 7 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	17726.68	1160.09	0.07	16.36	17.08
T2	17074.21	1215.93	0.07	17.80	

Tabel 11. Data analisis sampel variasi penambahan *R. pickettii* 10 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	9848.02	739.82	0.08	18.78	15.88
T2	11615.83	603.31	0.05	12.98	

Tabel 12. Data analisis sampel dengan penambahan *P. aeruginosa* 5 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	2179.39	219.44	0.10	25.17	22.04
T2	2141.03	161.88	0.08	18.90	

Tabel 13. Data analisis sampel dengan penambahan *B. subtilis* 5 ml

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	12720.99	1745.13	0.14	34.30	34.68
T2	12174.14	1707.04	0.14	35.05	

Tabel 14. Data analisis sampel variasi waktu penambahan *R.pickettii* hari Ke-1

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	993803	13234	0.01	3.33	4.29
T2	810841	17015	0.02	5.25	

Tabel 15. Data analisis sampel variasi waktu penambahan *R. pickettii* hari Ke-3

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	1931690	81943	0.04	10.61	10.52
T2	953056	39768	0.04	10.43	

Tabel 16. Data analisis sampel variasi waktu penambahan *R. pickettii* hari Ke-5

	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-rata
T1	1400649	249929	0.18	44.61	41.71
T2	696859	108156	0.16	38.80	

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan hasil penelitian bahwa penambahan bakteri *B. subtilis*, *P. aeruginosa* dan *R. pickettii* meningkatkan degradasi DDT oleh *G. trabeum*. Penambahan 10 mL *R. pickettii* menunjukkan hasil degradasi paling maksimum sebesar 80.81% selama 7 hari inkubasi. Waktu penambahan *R. pickettii* paling tepat pada degradasi DDT oleh *G. trabeum* yaitu hari ke-1 dengan hasil sebesar 92.41%. DDD merupakan metabolit produk yang dihasilkan pada degradasi DDT oleh campuran *R. pickettii* dan *G. trabeum*. Penelitian ini menunjukkan bahwa *R. pickettii* mempengaruhi biodegradasi DDT oleh *G. trabeum* dan terdapat hubungan sinergitas antara *G. trabeum* dan *R. pickettii*.

5.2 Saran

Hasil penelitian degradasi DDT oleh *G. trabeum* dan *R. pickettii* yang dilakukan selama 7 hari masih berupa DDD yang merupakan masih tergolong senyawa berbahaya. Oleh karena itu, perlu penelitian lebih lanjut mengenai laju reaksi dan waktu degradasi DDT sampai menghasilkan senyawa yang lebih sederhana dan lebih ramah lingkungan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Aguiar, A., Gavioli, D., dan Ferraz, A. (2013), "Extracellular activities and wood component losses during *Pinus taeda* biodegradation by the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*", *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 82, hal. 187-191.
- Ahmad, R., Salem, N. M., dan Estaitieh, H. (2010), "Occurrence of organochlorine pesticide residues in eggs, chicken and meat in Jordan", *Chemosphere*, Vol. 78, hal. 667-671.
- Aislabie, J. M., Richards, N. K., dan Boul, H. L. (1997), "Microbial degradation of DDT and its residues-A review", *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Vol. 40, hal. 269-282.
- Arantes, V., Jellison, J., dan Goodell, B. (2012), "Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 94, hal. 323-338.
- Ardrey, J. M. (2003), *Liquid Chromatography Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Inc, UK.
- Ashari, K. (2014), *Pengaruh Penambahan Pseudomonas aeruginosa terhadap Biodegradasi DDT oleh Pleurotus ostreatus*, ITS Surabaya, Surabaya.
- Atlas, R. M., dan Philp, J. (2005), *Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA.
- Barbusinski, K. (2009), "Fenton Reaction-Controversy Concerning The Chemistry", *Ecological Chemistry and Engineering S*, Vol. 16.
- Barragán-Huerta, B. E., Costa-Pérez, C., Peralta-Cruz, J., Barrera-Cortés, J., Esparza-García, F., dan Rodríguez-Vázquez, R. (2007), "Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the

- porous structure of green bean coffee", *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 59, hal. 239-244.
- Bennet, J. W., Wunch, K. G., dan Faison, B. D. (2002), *Use of Fungi Biodegradation*, ASM Press, Washington DC.
- Bonde, J. P., dan Toft, G. (2011), "DDT and Reproductive Health", In *Encyclopedia of Environmental Health*, hal. 1-5.
- Cheremisinoff, N. P., dan Rosenfeld, P. (2009), In *Handbook of Pollution Prevention and Cleaner Production - Best Practices in The Petroleum Industry*, William Andrew Publishing, Oxford.
- Coenye, T., Goris, J., Vos, P. D., Vandamme, P., dan LiPuma, J. J. (2003), "Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol 53, hal. 1075-1080.
- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kuba'tova, E., dan Halada, P. (2007), "Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* Alcohol Oxidase, an Extracellular Source of H₂O₂ in Brown Rot Decay of Wood", *Microbiology*, hal. 6241-6253.
- Deptan (2011) *Pedoman Pembinaan Penggunaan Pestisida*.
- Erkurt, H. (2010), *Biodegradation of Azo Dyes*, Springer Heidelberg Dordrecht, New York.
- Fahr K., Wetzstein, H., Grey, R., dan Schlosser, D. (1999), "Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 175, hal. 127-132.
- Fang, H., Dong, B., Yan, H., Tang, F., dan Yu, Y. (2010), "Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 184, hal. 281-289.

- Fiddaman, P. J., dan S. Rossall, S. (1993), "The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*", *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 74, hal. 119-126.
- Foght, J., April, T., Biggar, K., dan Aislabie, J. (2001), "Bioremediation of DDT-Contaminated Soils: A Review", *Bioremediation Journal*, Vol. 5, hal. 225-246.
- Folch, J., Lees, M., dan Stanley, G. H. S. (1957), "A simple method for the isolation and purification and purification of total lipids from animal tissue", *J. Biol. Chem*, Vol. 226, hal. 497-509.
- Fox, J. G., Barthold, S. W., Davisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W., dan Smith, A. L. (2007), *The Mouse in Biomedical Research*, Second.
- Gadd, G. (2001), *Fungi in Bioremediation*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Girlich, D., Naas, T., dan Nordmann, P. (2006), "Regulation of class D β -lactamase gene expression in *Ralstonia pickettii*", *Microbiology*, Vol. 152, hal. 2661-2672.
- Griffin, D. (1994), *Fungal Physiology*, 2nd edition, Wiley-Less. Inc, New york.
- Hanson, J. R. (2008), *The Chemistry of Fungi Departement of Chemistry*, University of Sussex, Brighton, UK.
- Harris, D. C. (2007), *Quantitative Chemical Analysis*. 7th edition, Craig Bleyer, USA.
- Harvey, D. (2000), *Modern Analytical Chemistry*, James M. Smith, North America.
- Hatmanti, A. (2000), "Pengenalan *Bacillus* spp", XXV, hal. 31-41.

- Hemachander, C., Bose, N., dan Puvanakrishnan, R. (2001), "Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production" *Process Biochemistry*, Vol. 36, hal. 629-633.
- Hisatsuka, K., Nakahara, T., Sano, N., dan Yamada, K. (1971), "Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation", *Agric. Biol. Chem*, Vol. 35, hal. 686-692.
- Itoh, S., dan Suzuki, T. (1972), "Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability", *Agric. Biol. Chem*, Vol. 36, hal. 2233-2235.
- Jensen, K. A., Houtman, C. J., Ryan, Z. C., dan Hammel, K. E. (2001), "Pathways for Extracellular Fenton Chemistry in the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*", *Applied and Environmental Microbiology*, hal. 0099-2240.
- Jeyaram, K., Romi, W., Singh, T. A., Adewumi, G. A., Basanti, K., dan Oguntoyinbo, F. A. (2011), "Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance", *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 87, hal. 161-164.
- Joo, A. R., Jeya, M., Lee, K. M., Sim, W. I., Kim, J. S., Kim, I. W., Kim, Y. S., Oh, D. K., Gunasekaran, P., dan Lee, J. K. (2009), "Purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 83, hal. 285-294.
- Joshi, S., Bharucha, C., dan Desai, A. J. (2008), "Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B", *Bioresource Technology*, Vol. 99, hal. 4603-4608.
- Juhasz, A., dan Naidu, R. (1999), "Apparent degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) by a *Cladosporium sp*", *Biotechnology Letters*, Vol. 21, hal. 991-995.

- Kamei, I., Yoshida, T., dan Enami, S. M. (2012), "Coexisting *Curtobacterium* Bacterium Promotes Growth of White-Rot Fungus *Stereum* sp, *Curr Microbiol*, Vol. 64, hal. 173-178.
- Kaneko, S., Yoshitake, K., Itakura, S., Tanaka, H., dan Enoki, A. (2005), "Relationship between production of hydroxyl radicals and degradation of wood, crystalline cellulose, and a lignin-related compound or accumulation of oxalic acid in cultures of brown-rot fungi", *J Wood Sci*, Vol. 51, hal. 262-269.
- Kataoka, R., dan Futai, K. (2009), "A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*", *Biol Fertil Soils*, Vol. 45, hal. 315-320.
- Kelley, S. S., Jellison, J., dan Goodell, B. (2003), "Use of NIR and pyrolysis-MBMS coupled with multivariate analysis for detecting the chemical changes associated with brown-rot biodegradation of spruce wood", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 209, hal. 107-111.
- Kerem, Z., Jensen, K. A., dan Hammel, K. E. (1999), "Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction", *FEBS Letters*, Vol. 446, hal. 49-54.
- Kim, M. K., Math, R. K., Cho, K. M., Shin, J. K., Jong Ok Kim, J. O., Ryu J. S., Lee, Y. H. dan Yun, H. D. (2008), "Effect of *Pseudomonas* sp. P7014 on the growth of edible mushroom *Pleurotus eryngii* in bottle culture for commercial production", *Bioresource Technology*, Vol. 99, hal. 3306-3308.
- Koch, A. K., Kappeli, O., Fiechter, A., dan Reiser, J. (1991), "Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants", *J. Bacteriol*, Vol. 173, hal. 2233-4219.
- Kosim, M., dan Putra, S. R. (2010), *Pengaruh Suhu Pada Protease Dari Bacillus subtilis*, ITS Surabaya, Surabaya.

- Lay, B. W., dan Hastowo, S. (1992), *Mikrobiologi*, 1st edition, Rajawali Pres, Jakarta.
- Lee, H., Jang, Y., Choi, Y. S., Kim, M. J., Lee, J., Lee, H., Hong, J. H., Lee, Y. M., Kim, G. H., dan Kim, J. J. (2014), "Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs", *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 97, hal. 56-62.
- Lindsay, S. (1992), *High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.
- Marrs, T. C., Ballantyne, B., Wiley J., dan Ballantyne, B. (2004), *Pesticide toxicology and international regulation*.
- Meryandini, A., Widhyastuti, N., dan Lestari, Y. (2008), "Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp", *Sains*, Vol. 12, hal. 55-60.
- Mille-Lindblom, C. (2005), "Interactions between Bacteria and Fungi on Aquatic Detritus-Causes and Consequences. Acta Universitatis Upsaliensis", *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*, hal. 46-42.
- Moore, E., dan Landecker, (1996), *Fundamentals of the fungi*, Four, Canada.
- Mulligan, C. N. (2005), "Environmental applications for biosurfactants", *Environmental Pollution*, Vol. 133, hal. 183-198.
- Munir, E. (2008), *Pemanfaatan Mikroba Dalam Bioremediasi: Suatu Teknologi Alternatif untuk Pelestarian Lingkungan*, USU e-Repository.
- Newcombe, D., Paszczyński A., Gajewska W., Kroger, M., Feis, G., dan Crawford, R. (2002), "Production of small molecular weight catalysts and the mechanism of trinitrotoluene degradation by several *Gloeophyllum* species. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 30, hal. 506-517.
- Niemenmaa, O. (2008), *Monitoring of Fungal Growth and Degradation of Wood*, Helsinki, Finland.

- Patterson, J. A., dan Ricke, S. C. (2015), "Effect of ethanol and methanol on growth of ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium* and *Butyrivibrio fibrisolvens*", *Journal of Environmental Science and Health*, Vol. 50, hal. 62-67.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H. dan Velázquez, E. (2009), "Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*", *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 9, hal. 1132-1147.
- Plaza, G. A., Wypych, J., Berry, C., dan Brigmon, R. L. (2007), "Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum contaminated soil", *World J Microbiol Biotechnol*, Vol. 23, hal. 533-542.
- Pornsunthorntawee, O., Arttaweeporn, N., Paisanjit, S., Somboonthanate, P., Abe M., Rujiravanit, R., dan Chavadej, S. (2008), "Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery", *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 42, hal. 172-179.
- Porto, A. L. M., Melgar, G. Z., Kasemodel, M. C., dan Nitschke, M. (2011), *Biodegradation of Pesticides, Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management, In Tech*.
- Pratama S. W., Sri-Sukanto, Asyiah, I. N., dan Ervina, Y. V. (2013), "Penghambatan Pertumbuhan Jamur Patogen Kakao *Phytophthora palmivora* oleh *Pseudomonas fluorescence* dan *Bacillus subtilis*", *Pelita Perkebunan*, Vol. 29, hal. 120-127.
- Purnomo, A. S., Kamei, I. dan Kondo, R. (2008), "Degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 105, hal. 614-621.

- Purnomo, A. S., Mori, T., Kamei, I., dan Kondo, R. (2011a), "Basic studies and applications on bioremediation of DDT: A review", *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 65, hal. 921-930.
- Purnomo, A. S., Mori, T., Kamei, I., Nishii, T., dan Kondo, R. (2010), "Application of mushroom waste medium from *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of DDT-contaminated soil", *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 64, hal. 397-402.
- Purnomo, A. S., Mori, T., Takagi, K., dan Kondo, R. (2011b), "Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi", *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 65, hal. 691-695.
- Purwoko, T. (2007), "*Fisiologi Mikroba*", PT. Bumi aksara, Jakarta.
- Richana, N., Irawadi, T. T., Nur, A., dan Syamsu, K., (2008), "Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase serta Karakterisasi Enzimnya", *Jurnal AgroBiogen*, Vol. 4, hal. 24-34.
- Ryan, M. P., Pembroke, J. T., dan Adley, C. C. (2006), "*Ralstonia pickettii*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism", *Journal of Hospital Infection*, Vol. 62, hal. 278-284.
- Salakkama, A., dan Webba, C. (2015), "The inhibition effect of methanol, as a component of crude glycerol, on the growth rate of *Cupriavidus necator* and other micro-organisms", *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 98, hal. 84-90.
- Schlegel, H. G. (1994), *Mikrobiologi Umum*. Edisi keenam, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, Indonesia.
- Septiningrum, K., dan Moeis, M. R. (2008), "Isolasi dan Karakterisasi Xilanase dari *Bacillus circulans*".

- Shreve, G. S., Inguva, S., dan Gunnam, S. (1995), "Rhamnolipid biosurfactan enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*", *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*, Vol. 4, hal. 331-337.
- Singh, H. (2006), *Mycoremediation : Fungal Bioremediation*, A John Wiley & Sons, INC, United States of America.
- Soerjani, M. (1990), "Trend of Pesticide Use in Indonesia and Asia Countries with Negative Impact to the Sustainable Agriculture and Enviromental", *Safe Agricon*, hal. 719-745.
- Solomons, T. W. G. (2011), *Organic Chemistry*. Tenth, John Wiley & Sons, Inc, United States of America.
- Subandi, L. N. P. (2014), *Karakteristik Geokimia Organik Fraksi Netral Batubara Pit Bintang BD-MD Sangatta, Kalimantan Timur*, ITS Surabaya, Surabaya.
- Villavicencio, R. T. (1998), "The history of blue pus", *Journal of the American College of Surgeons*, Vol. 187, hal. 212-216.
- Wang, Y., Guo L., dan Hyde, K. (2005), "Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences", Vol. 20, hal. 235-260.
- Wang S., Nomura, N., Nakajima, T., dan Uchiyama, H. (2012), "Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 113, hal. 624-630.
- Wang, Q., Tian, S., Long, J., dan Ning, P. (2014), "Use of Fe(II)Fe(III)-LDHs prepared by co-precipitation method in a heterogeneous-Fenton process for degradation of Methylene Blue", *Catalysis Today*, Vol. 224, hal. 41-48.
- Wonorahardjo, S. (2013), *Metode-metode Pemisahan Kimia Sebuah Pengantar*, Akademia Pertama, Jakarta Utara.

- Yang, X., Wang, S., Bian, Y., Chen F., Yu, G., Gu, C., dan Jiang, X. (2008), "Dicofol application resulted in high DDTs residue in cotton fields from northern Jiangsu province, China", *Journal of Hazardous Materials* Vol. 150, hal. 92-98.
- Yuantari, M. C. (2011), Dampak Pestisida Organoklorin terhadap Kesehatan Manusia dan Lingkungan Serta Penanggulangannya Prosiding Seminar Nasional "Peran Kesehatan Masyarakat dalam Pencapaian MDG's of Indonesia 12 April 2011.
- Zhang, Y., dan Miller, R. M. (1992), "Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant)", *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 58, hal. 3276-3282.
- Zhang, Y., dan Miller, R. M. (1994), "Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane", *App Environmental Microbiology*, Vol. 60, hal. 2101-2106.
- Zhang, Y., Maier, W. J., dan Miller, R. M. (1997), "Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenathrene", *Environ. Sci Technol*, Vol. 31, hal. 211-2217.

BIODATA PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Aulia Ulfi, dilahirkan di Bojonegoro, 29 November 1991, merupakan anak kedua dari bapak Sekar Dalem dan Ibu Siti Muawanah. Penulis telah menempuh pendidikan formal di TK Darma Wanita Bojonegoro (1996), SD Negeri 1 Tapelan Bojonegoro (1997), SMP Negeri 7 Bojonegoro (2003), SMA Negeri 3 Bojonegoro (2007), dan S1 Kimia ITS (2010) Pada tahun 2014, penulis diterima sebagai mahasiswa Master di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya dengan NRP 1414201032. Penulis mengambil bidang minat Biokimia-Biodegradasi menggunakan jamur dibawah bimbingan Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D. Selama menempuh pendidikan di ITS, penulis terlibat dalam penelitian kerjasama luar negeri diantaranya ITS-Kyushu University, Jepang (2015) dan ITS-Miyazaki of University, Jepang (2016). Selain itu, penulis pernah mengikuti seminar internasional baik dalam negeri maupun luar negeri. Salah satu motto penulis adalah “*Kejarlah duniamu seakan kamu hidup selamanya dan kejarlah akhiratmu seakan kamu mati besok*”. Penulis dapat dihubungi melalui email aulia.ulfy85@gmail.com.