



SKRIPSI-SK141501

**PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI
Pseudomonas aeruginosa TERHADAP
BIODEGRADASI DDT OLEH JAMUR
PELAPUK COKLAT *Gloeophyllum trabeum***

**NUR FAJRIYAH DAMAYANTI
NRP 1411 100 090**

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

**JURUSAN KIMIA
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2016**



SKRIPSI-SK141501

**THE EFFECT OF ADDITION OF BACTERIA
Pseudomonas aeruginosa TO DDT
BIODEGRADATION BY BROWN ROT
FUNGI *Gloeophyllum trabeum***

**NUR FAJRIYAH DAMAYANTI
NRP 1411 100 090**

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

**CHEMISTRY DEPARTMENT
Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2016**

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI
Pseudomonas aeruginosa TERHADAP BIODEGRADASI
DDT OLEH JAMUR PELAPUK COKLAT *Gloeophyllum*
*trabeum***

SKRIPSI

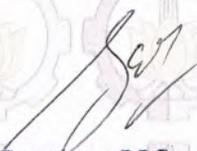
Disusun Oleh :

NUR FAJRIYAH DAMAYANTI
NRP. 1411 100 090

Surabaya, 3 Agustus 2016

Menyetujui,

Dosen Pembimbing


Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.
NIP 19800724 200812 1 002

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**


Prof. Dr. Didik Prasetyoko, S.Si., M.Sc.
NIP 19710616 199703 1 002

PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* TERHADAP BIODEGRADASI DDT OLEH JAMUR PELAPUK COKLAT *Gloeophyllum trabeum*

Nama : Nur Fajriyah Damayanti
NRP : 1411 100 090
Jurusan : Kimia FMIPA - ITS
Dosen Pembimbing : Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.

Abstrak

Pengaruh penambahan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap biodegradasi DDT oleh jamur pelapuk coklat *Gloeophyllum trabeum* telah diteliti. *P. aeruginosa* ditambahkan ke dalam 10 ml kultur *G. trabeum* dengan konsentrasi masing-masing sebesar 1, 3, 5, 7, dan 10 ml ($1 \text{ ml} \approx 1,337 \times 10^9 \text{ sel}$). Degradasi DDT tertinggi ditunjukkan pada penambahan 10 ml *P. aeruginosa* dengan jumlah degradasi sebesar 87,12% sedangkan jumlah degradasi DDT terendah terjadi pada penambahan 3 ml *P. aeruginosa* dengan jumlah degradasi sebesar 55,22%. Metabolit produk yang dihasilkan dari proses degradasi ini adalah DDD dan DDMU.

Kata kunci : Biodegradasi, *Gloeophyllum trabeum*, *Pseudomonas aeruginosa*, DDT

THE EFFECT OF ADDITION OF BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa* TO DDT BIODEGRADATION BY BROWN ROT FUNGI *Gloeophyllum trabeum*

Name : Nur Fajriyah Damayanti
NRP : 1411 100 090
Department : Kimia FMIPA - ITS
Supervisor : Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.

Abstract

Effect of addition of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* on biodegradation of DDT by brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* had been investigated. *P. aeruginosa* was added into 10 ml *G. trabeum* culture at 1, 3, 5, 7, and 10 ml (1 ml \approx 1,337 x 10⁹ cells). The addition of 10 ml of *P. aeruginosa* showed the highest DDT degradation about 87,12%, while the addition of 3 ml of *P. aeruginosa* showed the lowest one about 55,22%. Metabolite products of degradation process were DDD and DDMU.

Keywords: *Biodegradation, Gloeophyllum trabeum, Pseudomonas aeruginosa, DDT.*

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Pestisida	5
2.1.1 Definisi Pestisida	5
2.1.2 Klasifikasi Pestisida	5
2.1.3 Insektisida Organoklorin	6
2.1.4 Dikloro difenil Trikloroetana (DDT)	6
2.2 Jamur	9
2.2.1 Jamur Pelapuk Coklat	9
2.2.2 <i>Gloeophyllum trabeum</i>	9
2.3 Biosurfaktan	10
2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.5 Biodegradasi	14
2.6 Degradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	15
2.7 Degradasi DDT oleh <i>P. aeruginosa</i>	17
2.8 Degradasi DDT oleh Jamur dan Bakteri	17
2.9 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	18
2.10 UV-Vis	19
2.11 GC-MS	21
BAB III METODOLOGI	23

3.1	Alat dan Bahan	23
3.1.1	Alat	23
3.1.2	Bahan	23
3.2	Regenerasi Jamur <i>Gloeophyllum trabeum</i>	23
3.3	Persiapan Kultur Cair Jamur	24
3.4	Regenerasi Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.5	Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.6	Persiapan Kultur Cair Bakteri	24
3.7	Pembuatan Kurva Standar DDT	24
3.8	Biodegradasi DDT oleh <i>Gloeophyllum trabeum</i>	24
3.9	Biodegradasi DDT oleh Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.10	Pengaruh Penambahan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>Gloeophyllum trabeum</i>	24
3.11	Perolehan Ulang (<i>Recovery</i>) DDT dan Identifikasi Metabolit Produk	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		29
4.1	Kultur <i>Gloeophyllum trabeum</i>	29
4.1.1	Regenerasi Jamur <i>Gloeophyllum trabeum</i>	29
4.1.2	Persiapan Kultur Cair Jamur <i>Gloeophyllum trabeum</i>	30
4.2	Kultur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
4.2.1	Regenerasi Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
4.2.2	Kurva Pertumbuhan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	32
4.2.3	Persiapan Kultur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
4.3	Kurva Standard DDT	35
4.4	Proses dan Hasil Biodegradasi DDT	37
4.4.1	Biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	37

4.4.2 Biodegradasi DDT oleh Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	44
4.4.3 Pengaruh Penambahan <i>P. aeruginosa</i> terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i>	48
4.4.4 Jalur Degradasi	54
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1 Kesimpulan	57
5.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	65
Lampiran 1. Skema Kerja	65
Lampiran 2. Perhitungan	66
Lampiran 3. Data Analisis Sampel	69
BIODATA PENULIS	71

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Jenis Mikroba Penghasil Biosurfaktan dan Tipe Biosurfaktan yang Dihasilkan	11
Tabel 4.1 Data Kurva Standar DDT	35
Tabel 4.2 Jumlah degradasi DDT hasil biodegradasi oleh <i>P. aeruginosa</i> dengan waktu inkubasi selama 7 hari	45
Tabel 4.3 Jumlah degradasi DDT hasil biodegradasi oleh campuran <i>G. trabeum</i> dan <i>P. aeruginosa</i> dengan waktu inkubasi selama 7 hari	49
Tabel 4.4 Metabolit yang dihasilkan oleh masing-masing kultur	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Kimia Senyawa DDT dan DDD	8
Gambar 2.2 Reaksi Sintesis p,p' – Dikloro difenil trikloroetana	8
Gambar 2.3 Morfologi Jamur <i>G. trabeum</i> di alam	10
Gambar 2.4 Struktur Molekul mono-rhamnolipid.....	13
Gambar 2.5 Struktur Molekul di-rhamnolipid.....	13
Gambar 2.6 <i>P. aeruginosa</i> pada Nutrient Agar	14
Gambar 2.7 Jalur Degradasi DDT oleh jamur pelapuk coklat : <i>G. trabeum</i> , <i>D. dickinsii</i> , dan <i>F.</i> <i>pinicola</i> membentuk metabolit produk	16
Gambar 2.8 Diagram Blok HPLC	19
Gambar 2.9 Diagram Blok UV-Vis.....	20
Gambar 2.10 Diagram blok GC-MS	22
Gambar 4.1 Kultur Jamur <i>Gloeophyllum trabeum</i> setelah proses regenerasi selama 15 hari	30
Gambar 4.2 Kultur bakteri <i>P. aeruginosa</i>	32
Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i>	34
Gambar 4.4 Kurva Standar DDT	36
Gambar 4.5 Inkubasi Sampel Degradasi DDT oleh <i>G.</i> <i>trabeum</i>	38
Gambar 4.6 Kromatogram GC sampel <i>G. trabeum</i>	41
Gambar 4.7 Spektra MS Piren pada database	41
Gambar 4.8 Spektra MS Piren pada sampel Jamur <i>G.</i> <i>trabeum</i>	42
Gambar 4.9 Spektra MS DDT pada database.....	43
Gambar 4.10 Spektra MS DDT pada sampel Jamur <i>G.</i> <i>trabeum</i>	43
Gambar 4.11 Spektra MS DDD pada database	44

Gambar 4.12 Spektra MS DDD pada sampel Jamur <i>G. trabeum</i>	44
Gambar 4.13 Jumlah DDT terdegradasi oleh <i>P. aeruginosa</i> dengan variasi konsentrasi bakteri yang diinkubasi selama 7 hari	45
Gambar 4.14 Kromatogram GC sampel bakteri <i>P. aeruginosa</i>	46
Gambar 4.15 Spektra MS DDD pada sampel <i>P. aeruginosa</i>	47
Gambar 4.16 Spektra MS DDMU pada database	48
Gambar 4.17 Spektra MS DDMU pada sampel <i>P. aeruginosa</i>	48
Gambar 4.18 Jumlah DDT terdegradasi oleh <i>P. aeruginosa</i> dengan variasi konsentrasi bakteri yang diinkubasi selama 7 hari.....	40
Gambar 4.19 Kromatogram GC sampel <i>G. trabeum</i> dengan penambahan bakteri <i>P. aeruginosa</i>	51
Gambar 4.20 Spektra MS DDD sampel <i>G. trabeum</i> dengan penambahan bakteri <i>P. aeruginosa</i>	52
Gambar 4.21 Spektra MS DDMU sampel <i>G. trabeum</i> dengan penambahan bakteri <i>P. aeruginosa</i>	52
Gambar 4.22 Jalur Degradasi DDT menjadi DDD dan DDMU oleh bakteri aerobik.....	54
Gambar 4.23 Jalur Degradasi DDT oleh <i>G. trabeum</i> , <i>P. aeruginosa</i> , dan campuran keduanya.....	55

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Salah satu inovasi pemberantasan hama yang paling efisien hingga saat ini adalah dengan menggunakan pestisida. Pestisida merupakan suatu zat kimia dan bahan lain, serta suatu zat renik yang digunakan untuk memberantas atau mencegah hama-hama dan penyakit yang merusak tanaman, bagian-bagian tanaman atau hasil-hasil pertanian (Permentan, 2007). Terdapat banyak jenis pestisida, salah satunya adalah kelompok organoklorin.

Organoklorin secara kimia tergolong insektisida yang memiliki toksisitas relatif rendah, akan tetapi mampu bertahan lama dalam lingkungan. Racun ini bersifat mengganggu susunan syaraf dan larut dalam lemak. Insektisida organoklorin pertama yang ditemukan dan dipergunakan ialah DDT (Dikloro Difenil Trikloroetana). DDT pertama kali disintesis oleh Othmar Zeidler tahun 1873, namun efek insektisidanya baru ditemukan oleh Paul Muller tahun 1939 (Djojsumarto, 2008).

DDT telah dilarang penggunaannya karena sifatnya yang cenderung untuk terbioakumulasi dalam jaringan hewan (Marrs, 2004). Apabila makhluk hidup memakan sesuatu yang mengandung DDT, sebagian DDT akan tertinggal di jaringan lemak tubuh karena senyawa ini sangat lipofilik atau mudah larut dalam lemak, dan sulit terdegradasi (Sumardjo, 2008). Berdasarkan SK Menteri Pertanian RI No. 434.1/Kpts/TP.270/7/2001 yang menjelaskan tentang Syarat dan Tata Cara Pendaftaran Pestisida, maka di Indonesia penggunaan DDT sudah mulai dilarang. Namun hingga kini, kadar DDT di lingkungan masih tergolong besar. Untuk meminimalisir adanya akumulasi berlebih dari polutan pencemar lingkungan, maka perlu dilakukan proses degradasi. Salah satu metode yang aman dan ramah lingkungan untuk mendegradasi DDT adalah dengan menggunakan biodegradasi. Biodegradasi adalah suatu metode ramah lingkungan untuk mendegradasi suatu senyawa menjadi bentuk yang sederhana dan

kurang toksik atau *non*-toksik dengan menggunakan mikroorganisme (jamur atau bakteri) sebagai agen pendegradasi.

Jamur yang dapat digunakan untuk agen pendegradasi salah satunya adalah jamur pelapuk coklat (*Brown Rot Fungi*) dari kelompok Basidiomycetes, yaitu *Gloeophyllum trabeum*. Purnomo dkk (2008) dalam penelitiannya melaporkan bahwa *G. trabeum* mampu mendegradasi DDT hingga 87% dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) setelah masa inkubasi 28 hari. Hasil ini cukup signifikan bila dibandingkan dengan kemampuan jamur pelapuk coklat yang lain dalam mendegradasi DDT. Akan tetapi, hasil tersebut masih memerlukan waktu yang relatif lama, sehingga diperlukan pengembangan metode untuk meningkatkan hasil degradasi dengan waktu yang lebih singkat yaitu dengan penambahan bakteri.

Golovleva (1980) telah melaporkan adanya pengaruh bakteri penghasil biosurfaktan *Pseudomonas aeruginosa* dalam mendegradasi DDT. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme seperti *P. aeruginosa* dapat menghasilkan molekul amfipatik yang dapat menurunkan tegangan permukaan. Karena sifat DDT adalah non-polar (hidrofobik), maka dengan penambahan biosurfaktan diharapkan DDT akan dapat bersifat lebih hidrofilik agar kelarutan antara DDT sebagai substrat dengan enzim lebih meningkat dan degradasi DDT oleh *G. trabeum* dapat berlangsung lebih optimal. Selain itu, Bidlan (2003) melaporkan bahwa *P. aeruginosa* yang diinkubasi secara aerob mampu mendegradasi DDT lebih jauh menjadi DDMU, DDMS, DDOH, DDA, 2-CBP, 4-CP, 4-CBA, serta dua metabolit yang terdeteksi pada fase aquos yakni catechol dan hidroquinon menggunakan pepton-gliserasol sebagai media pertumbuhan dan diinkubasi pada *rotary shaker* kecepatan 180 rpm.

Dari hasil analisis biodegradasi DDT oleh jamur tiram (*P. ostreatus*) dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa* menggunakan HPLC diperoleh jumlah degradasi DDT oleh *P. ostreatus* dengan penambahan bakteri 1, 3, 5, dan 10 ml masing-masing sebesar 23,14 %, 86,14 %, 68,95 %, dan 29,52 % (Ashari, 2014).

Penambahan *P. aeruginosa* ke dalam kultur *P. ostreatus* ternyata mengakibatkan jumlah degradasi DDT oleh *P. ostreatus* cenderung meningkat jika dibandingkan dengan jumlah degradasi DDT oleh *P. ostreatus* tanpa penambahan *P. aeruginosa*. Peningkatan jumlah degradasi ini terjadi karena adanya sinergitas antara *P. ostreatus* dengan *P. aeruginosa*, hal ini karena *P. aeruginosa* memproduksi biosurfaktan berupa rhamnolipid (Datta, 2011). Berdasarkan uraian tersebut, pada penelitian ini biodegradasi DDT oleh jamur *G. trabeum* dioptimasi dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa*.

1.2. Rumusan Masalah

Jamur *G. trabeum* memiliki potensi untuk mendegradasi DDT. Akan tetapi, kemampuannya masih relatif rendah dan membutuhkan waktu yang lama, sehingga diperlukan pengembangan metode untuk meningkatkan degradasinya. Dari penelitian-penelitian sebelumnya, bakteri *P. aeruginosa* dapat memproduksi biosurfaktan (Golovleva, 1980) dan dapat mendegradasi DDT (Bidlan, 2003; Ashari, 2014), sehingga penambahan bakteri ini diharapkan dapat memberikan pengaruh positif dalam meningkatkan proses degradasi DDT oleh jamur *G. trabeum*. Berdasarkan hal tersebut, diperlukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan bakteri *P. aeruginosa* terhadap biodegradasi DDT oleh jamur *G. trabeum*.

1.3. Batasan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini dibatasi pada variasi konsentrasi bakteri *P. aeruginosa* yang ditambahkan ke dalam kultur *G. trabeum* untuk proses degradasi DDT yaitu 1, 3, 5, 7 dan 10 ml ($1 \text{ ml} \approx 1,337 \times 10^9$ sel bakteri /ml kultur), dengan volume total campuran jamur dan bakteri yaitu 20 ml untuk proses degradasi DDT selama 7 hari. Variabel yang dianalisis adalah jumlah DDT yang terdegradasi dan metabolit produk yang dihasilkan.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh penambahan bakteri *P. aeruginosa* terhadap proses degradasi DDT oleh *G. trabeum*.
2. Mengetahui metabolit produk yang dihasilkan selama proses degradasi DDT.

1.5. Manfaat Penelitian

1. Memberikan data ilmiah mengenai pengaruh penambahan bakteri penghasil biosurfaktan *P. aeruginosa* terhadap laju degradasi DDT oleh jamur *G. trabeum*.
2. Memberikan referensi yang aktual untuk menangani masalah pencemaran DDT di lingkungan.
3. Memberikan alternatif penanganan masalah nasional khususnya limbah DDT dengan menggunakan jamur *G. trabeum* sebagai metode yang murah, aman, cepat dan efektif sehingga akan membantu pemerintah dalam proses pelestarian lingkungan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pestisida

2.1.1. Klasifikasi Pestisida

Sesuai dengan Peraturan Pemerintah No. 7 tahun 1973, yang dimaksud dengan pestisida adalah semua zat kimia dan bahan lain serta jasad renik dan virus yang dipergunakan untuk :

- a) Memberantas atau mencegah hama-hama dan penyakit yang merusak tanaman, bagian-bagian tanaman atau hasil-hasil pertanian
- b) Memberantas rerumputan atau tanaman pengganggu/gulma
- c) Mematikan daun dan mencegah pertumbuhan tanaman yang tidak diinginkan
- d) Mengatur atau merangsang pertumbuhan tanaman atau bagian-bagian tanaman
- e) Memberantas atau mencegah hama-hama luar pada hewan-hewan peliharaan dan ternak
- f) Memberantas atau mencegah hama-hama air
- g) Memberantas atau mencegah binatang-binatang dan jasad-jasad renik dalam rumah tangga, bangunan, dan alat-alat pengangkutan
- h) Memberantas atau mencegah binatang-binatang yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia dan binatang yang perlu dilindungi dengan penggunaan pada tanaman, tanah, dan air

Dalam Undang-Undang No. 12 Tahun 1992 tentang Sistem Budidaya Tanaman, yang dimaksud dengan pestisida adalah zat pengatur dan perangsang tumbuh, bahan lain, serta organisme renik, atau virus yang digunakan untuk melakukan perlindungan tanaman (Suprpti, 2011).

Ditinjau dari jenis sasaran penggunaan, pestisida dapat dibedakan menjadi beberapa jenis :

- a) Akarisida, berfungsi untuk membunuh tungau atau kutu

- b) Algasida, berfungsi untuk membunuh alga
- c) Alvisida, berfungsi untuk pembunuh atau penolak burung
- d) Bakterisida, berfungsi untuk membunuh bakteri
- e) Fungisida, berfungsi untuk membunuh jamur atau cendawan
- f) Herbisida, berfungsi untuk membunuh gulma
- g) Insektisida, berfungsi untuk membunuh serangga
- h) Molluskisida, berfungsi untuk membunuh siput
- i) Nematisida, berfungsi untuk membunuh nematode
- j) Ovisida, berfungsi untuk merusak telur
- k) Pedukullisida, berfungsi untuk membunuh kutu
- l) Piscisida, berfungsi untuk membunuh ikan
- m) Rodentisida, berfungsi untuk membunuh binatang pengerat
- n) Termisida, berfungsi untuk membunuh rayap

(Suprapti, 2011).

2.1.2. Insektisida Organoklorin

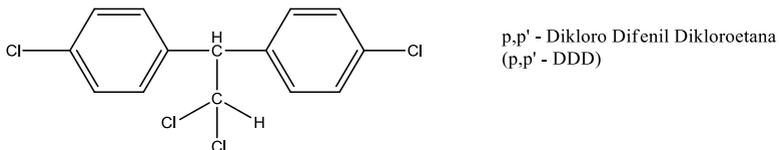
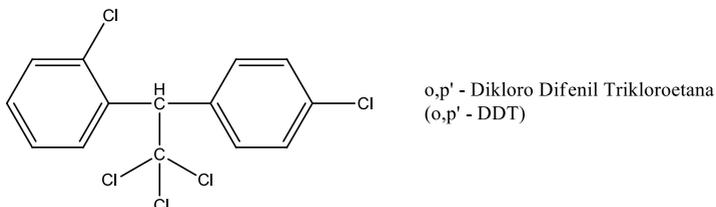
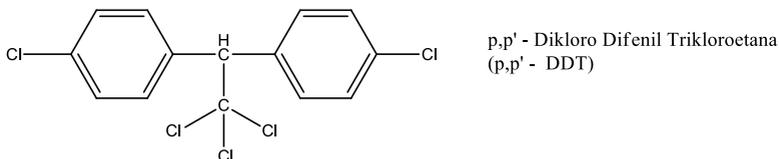
Salah satu bentuk organoklorin yang sering dijumpai adalah dalam bentuk insektisida. Organoklorin merupakan polutan yang cukup persisten dan bersifat dapat terbioakumulasi di alam serta bersifat toksik terhadap manusia dan makhluk hidup lainnya. Organoklorin tidak reaktif, stabil, memiliki kelarutan yang sangat tinggi dalam lemak, dan memiliki kemampuan degradasi yang rendah (Soemirat, 2005). Karena sifatnya tersebut, sebagai pestisida, organoklorin termasuk ampuh dan sangat menguntungkan dalam mengontrol hama. Namun karena sulit terbiodegradasi, maka organoklorin dapat terakumulasi dalam jaringan hewan yang prosesnya disebut biokonsentrasi (Karina, 2002).

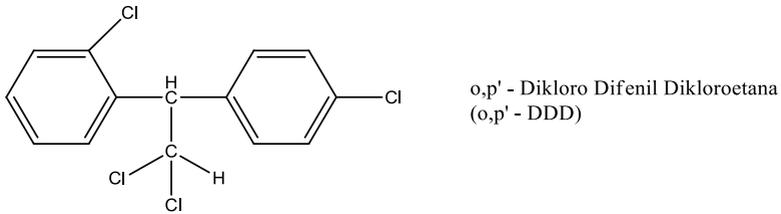
2.1.3. Dikloro difenil trikloroetana (DDT)

Dikloro difenil trikloroetana (DDT) merupakan salah satu insektisida organoklorin yang bersifat toksik. Panut (2008) menjelaskan bahwa DDT pertama kali disintesis oleh Zeidler, seorang sarjana kimia dari Jerman pada tahun 1874. Selanjutnya,

pada tahun 1973 diketahui bahwa DDT sangat membahayakan bagi kehidupan maupun lingkungan karena sifatnya yang lipofilik dan dapat terbioakumulasi dalam jaringan melalui rantai makanan. DDT merupakan racun non seismik, racun kontak, dan racun perut yang sangat persisten di lingkungan. LD₅₀ terhadap tikus sebesar 113-118, mencit 150-300, kelinci 300, anjing, 500-700, dan kambing > 1000 mg/kg berat badan.

Bentuk struktur senyawa DDT dan metabolit produk degradasi DDT berupa DDD dapat dilihat pada gambar 2.1 berikut,

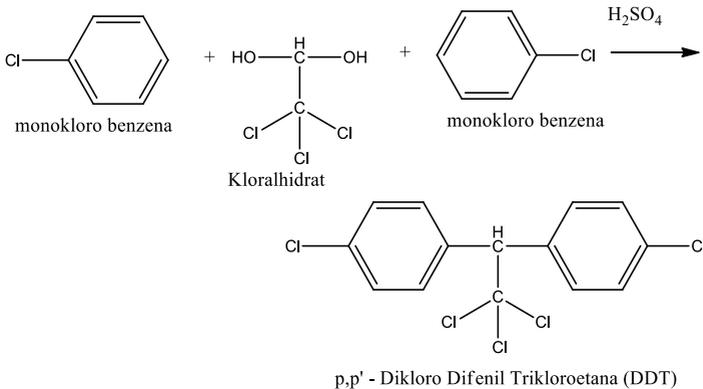




Gambar 2.1 Struktur Kimia Senyawa DDT dan DDD

(Nurfina, 1993)

DDT disintesis dengan cara kondensasi katalitik monokloro benzen dengan kloral seperti terlihat pada gambar 2.2 berikut,



Gambar 2.2 Reaksi Sintesis p,p' – Dikloro difenil trikloroetana

(Nurfina, 1993)

Bentuk padat DDT berupa serbuk putih atau kristal berbentuk jarum-jarum dan berbau tajam. DDT akan mencair pada suhu 108-109°C. DDT hampir tidak larut dalam air, asam encer, dan alkali, tetapi larut dalam lemak, piridin, dan dioksan. Kelarutan DDT dalam 100 ml: aseton = 58 g; benzen = 78 g; benzilbenzoat = 42 g; karbon tetraklorida = 45 g; etanol 95% = 2 g; kerosen = 8 g;

dietil eter = 28 g; tetralin = 61 g; dan sikloheksanon = 116 g (Sumardjo, 2008).

2.2. Jamur

2.2.1. Jamur Pelapuk Coklat

Dalam dunia biologi, jamur dikategorikan sebagai kelompok cendawan sejati. Pada dinding sel jamur terdiri atas kitin, dan sel jamur tidak mengandung klorofil. Jamur memperoleh makanan secara heterotrof dengan mengambil makanan dari bahan organik. bahan organik di sekitar tempat tumbuhnya diubah menjadi molekul-molekul sederhana dan diserap langsung oleh hifa. Di sini dapat dilihat perbedaan antara jamur dengan organisme heterotrof lain yang langsung menelan makanannya kemudian mencernanya sebelum diserap (Gunawan, 2000). Adapun pertumbuhan dan perkembangan jamur dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti temperatur, oksigen, kelembaban, konsentrasi hidrogen (pH), nutrisi (Tambunan, 1989).

Jamur juga dikategorikan sebagai jasad renik yang sering menimbulkan kerusakan pada kayu. Jasad renik adalah sejenis tumbuhan tingkat rendah yang tidak mengandung klorofil, sehingga untuk mempertahankan hidupnya mereka mengambil energi dari bahan organik yang dihasilkan oleh tumbuhan hijau. Oleh karena itu, kayu sebagai produk terbesar tumbuhan yang berklorofil menjadi sumber makanan bagi berbagai jenis jamur dan bakteri (Tambunan, 1989).

Salah satu jamur perusak kayu yang sering dijumpai adalah jenis Brown Rot Fungi. Tambunan dan Nandika (1989) menjabarkan bahwa *brown rot fungi* merupakan jamur tingkat tinggi dari kelas Basidiomycetes. Golongan jamur ini menyerang holoselulosa kayu dan meninggalkan residu kecoklatan yang kaya akan lignin.

2.2.2. *Gloeophyllum trabeum*

Gloeophyllum trabeum adalah spesies jamur pelapuk coklat yang tumbuh setiap tahun. *G. trabeum* merupakan spesies dari

kelas Basidiomycetes yang sering dijumpai tumbuh di atas tumpukan kayu. Dengan morfologi jamur rata-rata seluas 3 cm, panjang 8 cm, dan tebal 8 mm. Permukaan *G. trabeum* terasa halus dan lembut. Ketika sudah tua, jamur ini akan berwarna coklat hazelnut keabu-abuan. Morfologi jamur *G. trabeum* seperti terlihat pada gambar 2.3 berikut ini.



Gambar 2.3 Morfologi Jamur *G. trabeum* di alam

(Adan, 2011)

Berikut taksonomi dari jamur *G. trabeum* :

Kerajaan	: Fungi
Filum	: Basidiomycota
Kelas	: Basidiomycetes
Sub-kelas	: Incertaesedis
Ordo	: Gloeophyllales
Famili	: Gloeophyllaceae
Marga	: Gloeophyllum
Jenis	: <i>G. trabeum</i>

(Bucher, 2011).

2.3. Biosurfaktan

Surfaktan adalah molekul amfipatik yang terdiri dari gugus hidrofilik dan hidrofobik, sehingga dapat berada di antara cairan

yang memiliki sifat polar dan ikatan hidrogen yang berbeda seperti di antara minyak dan air. Hal ini menyebabkan surfaktan mampu mereduksi tegangan permukaan dan antar permukaan serta membentuk mikroemulsi sehingga hidrokarbon dapat larut dalam air dan begitu pun sebaliknya (Desai dan Banat, 1997).

Biosurfaktan merupakan senyawa amphilik yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang merupakan senyawa kompleks dengan struktur bermacam-macam. Biosurfaktan dapat dihasilkan oleh mikroorganisme prokariot maupun eukariot. Bakteri penghasil biosurfaktan antara lain *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*. Biosurfaktan ini dihasilkan pada permukaan sel mikroba atau diekskresikan ke lingkungan yang dapat membantu melepaskan senyawa hidrokarbon dalam senyawa organik dan meningkatkan konsentrasi senyawa hidrokarbon dalam air melalui pelarutan ataupun emulsifikasi (Banat, 1995).

Kosaric (1992) menyebutkan beberapa keunggulan biosurfaktan dibandingkan dengan surfaktan sintetis yaitu :

- a) Bersifat biodegradabel
- b) Memiliki toksisitas yang rendah
- c) Biokompatibel dan digestibel, sehingga dapat digunakan dalam kosmetik, obat-obatan, dan aditif makanan
- d) Biosurfaktan dapat diproduksi dari material yang murah dengan jumlah besar.
- e) Berguna sebagai kontrol lingkungan

Kosaric (1992) menyatakan bahwa ada perbedaan jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh setiap mikroba.

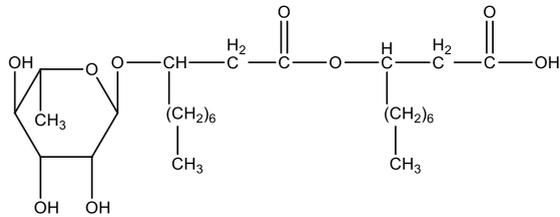
Biosurfaktan dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok, seperti : glikolipid, lipopeptida, lipoposakarida, fosfolipid, dan asam lemak. Namun dalam peranannya sebagai biosurfaktan, yang lebih banyak digunakan adalah kelompok glikolipid, yang dikenal sebagai rhamnolipid. Jenis mikroba penghasil biosurfaktan tersebut dapat dilihat pada tabel 2.1 berikut,

Tabel 2.1 Jenis Mikroba Penghasil Biosurfaktan dan Tipe Biosurfaktan yang Dihasilkan

No.	Spesies Mikroba	Jenis Biosurfaktan
1	<i>Torulopsis bombicola</i>	Glikolipid (sophorosa lipid)
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glikolipid (rhamnosa lipid)
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipoprotein (surfactin)
4	<i>Bacillus subtilis</i>	Lipoprotein (surfactin)
5	<i>Pseudomonas sp.</i> DSM 2874	Glikolipid (rhamnosa lipid)
6	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Sukrosa dan fruktosa glikolipid
7	<i>Arthrobacter</i>	Glikolipid
8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rhamnosa lipid
9	<i>Pseudomonas sp.</i> MUB	Rhamnosa lipid
10	<i>Torulopsis petrophilurn</i>	Glikolipid dan protein
	<i>Candida tropicalis</i>	Komplek polisakarida dan asam lemak glikolipid
	<i>Acinetobacter sp.</i> HOI-N	Asam lemak, mono dan gliserida
11	<i>Candida petrophilum</i>	Peptidolipid
12	<i>Nocardia erythropolis</i>	Lemak netral

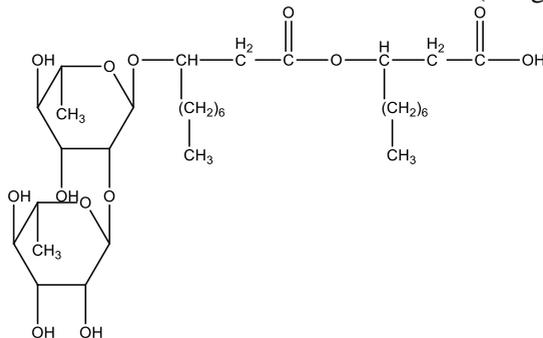
(Kosaric, 1992)

Rhamnolipid terbagi menjadi dua kelompok besar yakni mono-rhamnolipid dan di-rhamnolipid. Seperti terlihat pada gambar 2.4, mono rhamnolipid (paling banyak diproduksi dari *Pseudomonas aeruginosa*) memiliki struktur umum *L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate*, atau sering disebut sebagai Rha-C₁₀-C₁₀ dengan rumus molekul C₂₆H₄₈O₉. Sedangkan pada gambar 2.5, dapat dilihat struktur di-rhamnolipid memiliki dua cincin gula rhamnosa, dengan struktur umum *L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate* dan sering disebut sebagai Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ dengan rumus molekul C₃₂H₅₈O₁₃.



Gambar 2.4 Struktur Molekul mono-rhamnolipid

(Lang, 1999)



Gambar 2.5 Struktur Molekul di-rhamnolipid

(Lang, 1999)

Rhamnolipid dapat dideteksi dengan pengukuran tegangan permukaan, hemolisis sel darah merah, dan pengendapan *Methylene Blue Agar* (MBA). Struktur molekul rhamnolipid dapat dikonfirmasi dengan spektroskopi inframerah (Rahman dkk, 2010).

2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas pertama kali dibuat oleh Migula (1894) untuk genus yang meliputi spesies tunggal, *P. violacea*. Migula (1900) mempublikasikan kombinasi baru *Pseudomonas aeruginosa* dengan nama lain : *Bacterium aeruginosum*, *Bacterium aeruginosus*, dan *Bacillus pyocyaneus*. Bakteri *P. aeruginosa* pada media nutrisi agar ditunjukkan pada gambar 2.6 berikut ini.



Gambar 2.6 *P. aeruginosa* pada Nutrien Agar
(Todar, 2004).

Berikut taksonomi dari *P. aeruginosa* :

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma proteobacteria
Ordo	: Pseudomonales
Famili	: Pseudomonadaceae
Marga	: Pseudomonas
Jenis	: <i>P. aeruginosa</i>

(Migula, 1900).

Bakteri *P. aeruginosa* dapat digunakan sebagai penghasil biosurfaktan rhamnolipid yang berfungsi untuk meremediasi logam berat (Hugh dkk, 1964).

2.5. Biodegradasi

Proses degradasi terjadi ketika pestisida yang digunakan berhasil diuraikan oleh agen pendegradasi (mikroba), reaksi kimia, dan sinar matahari. Prosesnya dapat terjadi dalam hitungan jam, hari, sampai tahunan bergantung pada kondisi lingkungan dan sifat-sifat pestisida (Manuaba, 2009). Beberapa bakteri yang diisolasi dari tanah dan perairan sungai mampu mendegradasi senyawa pestisida dan menggunakannya sebagai sumber karbon serta memiliki gen metabolisme dalam plasmidnya (Sabdon, 2003). Bakteri yang tetap bertahan hidup di lingkungan yang

mengandung pestisida merupakan ekspresi bakteri yang mampu hidup dan dapat mendegradasi pestisida (Rahmansyah dan Sulistianah, 2009).

Sebagai cara mengetahui alur degradasi atau biokonversi, beberapa hal seperti pengenalan karakter metabolisme mikroba, dan spesifitas enzim terhadap substrat residu pestisida dapat menjadi acuan dalam upaya menghilangkan cemaran pestisida dalam tanah (Rahmansyah dan Sulistianah, 2009). Optimasi proses degradasi oleh mikroba ini dapat terjadi bila temperatur dan pH tanah cocok untuk pertumbuhan mikroba, cukup oksigen, dan fertilitas tanahnya cukup baik (Manuaba, 2009).

2.6. Degradasi DDT oleh *G. trabeum*

Purnomo dkk. (2008) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa jamur pelapuk putih dan jamur pelapuk coklat dapat digunakan untuk mendegradasi DDT. Pada dasarnya, terdapat perbedaan mekanisme degradasi kayu oleh kedua jamur tersebut. Dalam proses degradasinya, *Brown Rot Fungi* (BRF) menggunakan reaksi ekstraseluler dari hidrogen peroksida dengan Fe^{2+} yang dikenal sebagai reaksi Fenton. Hal ini dikarenakan BRF tidak mengandung enzim lignolitik. Salah satu BRF yang telah diteliti dapat mendegradasi DDT adalah *G. trabeum*. Jalur degradasi DDT oleh *G. trabeum* dapat dilihat pada gambar 2.7 berikut,

Purnomo dkk. (2011) dalam penelitiannya melaporkan bahwa *G. trabeum* mampu mendegradasi DDT hingga 84% dalam media *potato dextrose broth* (PDB) setelah masa inkubasi 14 hari.

2.7. Degradasi DDT oleh *P. aeruginosa*

Secara umum, bakteri dapat mendegradasi DDT secara aerob atau anaerob. Lal dan Saxena (1982) menyatakan bahwa secara umum bakteri yang diinkubasi secara aerob akan mendegradasi DDT melalui reaksi dehidroklorinasi dengan metabolit produk berupa DDE, namun ketika diinkubasi secara anaerob, maka reaksi reduktif deklorinasi menjadi yang dominan dan menghasilkan DDD sebagai metabolit produk utama.

Reaksi reduktif deklorinasi terjadi ketika bakteri anaerob mengalami kekurangan aseptor elektron alami seperti NO_3^- , SO_4^{2-} , sehingga bakteri menggunakan senyawa aromatik terklorinasi tertentu sebagai aseptor elektron, proses ini disebut halorespirasi. Reaksi reduktif deklorinasi secara umum terjadi dibawah kondisi anaerob, namun dapat juga terjadi pada proses degradasi secara aerob terhadap senyawa terklorinasi tinggi tertentu (Bidlan, 2003).

Bidlan (2003) melaporkan bahwa *P. aeruginosa* yang diinkubasi secara aerob mampu mendegradasi DDT lebih jauh menjadi DDMU, DDMS, DDOH, DDA, 2-CBP, 4-CP, 4-CBA, serta dua metabolit yang terdeteksi pada fase aquos yakni catechol dan hidroquinon menggunakan pepton-gliserol sebagai media pertumbuhan dan diinkubasi pada *rotary shaker* kecepatan 180 rpm. Golovleva dan Skryabin (1980) juga melaporkan bahwa *P. aeruginosa* strain 640X mampu mendegradasi DDT secara signifikan dengan memproduksi metabolit non-klorinasi berupa fenilasetat, fenilpropinoat, dan asam salisilat dengan adanya senyawa co-metabolisme.

2.8. Degradasi DDT oleh Jamur dan Bakteri

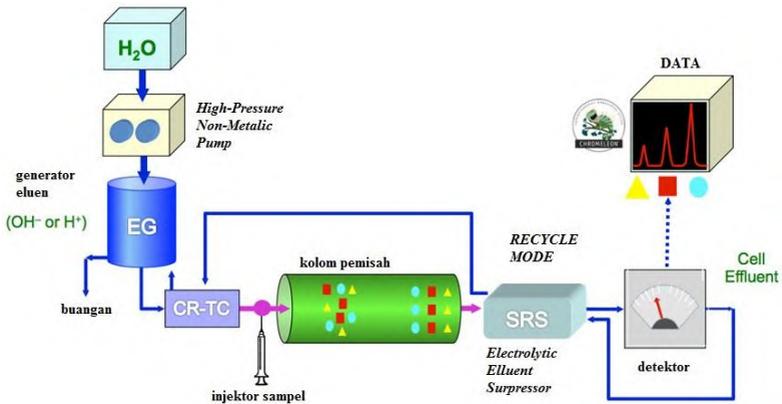
Dari hasil analisis biodegradasi DDT oleh jamur tiram dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa* menggunakan HPLC diperoleh jumlah degradasi DDT oleh *P. ostreatus* dengan penambahan bakteri 1, 3, 5, dan 10 ml masing-masing sebesar

23,14 %, 86,14 %, 68,95 %, dan 29,52 % (Ashari, 2014). Penambahan *P. aeruginosa* ke dalam kultur *P. ostreatus* ternyata mengakibatkan jumlah degradasi DDT oleh *P. ostreatus* cenderung meningkat jika dibandingkan dengan jumlah degradasi DDT oleh *P. ostreatus* tanpa penambahan *P. aeruginosa*. Peningkatan jumlah degradasi ini terjadi karena adanya sinergisitas antara *P. ostreatus* dengan *P. aeruginosa*, hal ini karena *P. aeruginosa* memproduksi biosurfaktan berupa rhamnolipid (Datta, 2011).

2.9. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan suatu sistem pemisahan yang memiliki kecepatan dan efisiensi tinggi. Hal ini dikarenakan HPLC didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom dan memiliki sistem pompa tekanan tinggi. HPLC mampu menganalisa berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (POM, 1995).

Kegunaan umum HPLC adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (*impurities*) dan analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (Putra, 2007). Keterbatasan metode HPLC adalah untuk identifikasi senyawa, kecuali jika HPLC dihubungkan dengan spektrometer massa (MS). Selain itu jika sampelnya sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh (Munson, 1991). Dalam kromatografi, zat-zat terlarut (*solut*) terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi akibat dilewatkan dalam suatu kolom kromatografi. Pemisahan zat terlarut ini diatur oleh distribusi dalam fase gerak dan fase diam. Kondisi operasional sangat mempengaruhi kinerja kromatografi cair, misalnya jenis kolom, kecepatan alir fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel (Rohman, 2007). Diagram blok HPLC dapat dilihat pada gambar 2.8 berikut,



Gambar 2.8 Diagram Blok HPLC

(Russ, 1986).

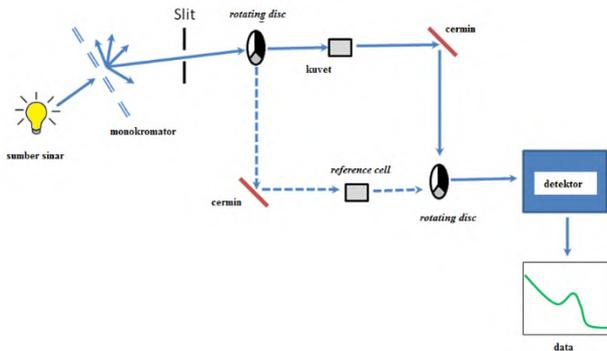
Pada gambar tersebut dijelaskan bahwa nantinya komponen-komponen dalam sampel akan terpisah akibat adanya perbedaan kecepatan migrasi dari komponen-komponen dalam sampel yang terjadi karena adanya perbedaan keseimbangan distribusi dalam fasa diam dan fasa gerak. Di dalam HPLC, fasa diam dan fasa gerak dapat berinteraksi secara selektif dengan sampel. Interaksi seperti pembentukan kompleks atau ikatan hidrogen dapat terjadi dalam fasa gerak HPLC (Lindsay, 1992).

2.10. UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar UV dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektrum UV-Vis berbentuk lebar dan sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit dalam larutan bisa ditentukan

dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu menggunakan hukum Lambert-Beer (Dachriyanus, 2004).

Utamanya, UV-Vis digunakan untuk mengukur sampel dalam bentuk liquid atau larutan. Metode ini lebih sederhana dan menghasilkan pengukuran kuantitatif yang lebih akurat. Jika menggunakan teknik UV-Vis, maka harus digunakan kuvet (*cells*) sebagai wadah larutan atau liquid pada daerah sampel spektrofotometer. Idealnya, kuvet harus benar-benar transparan pada semua panjang gelombang yang nantinya akan digunakan karena absorbansi dari kuvet itu sendiri dapat mengurangi rentang dinamik linear efektif. Kuvet acrylic tidak resisten dengan semua jenis pelarut dan menyerap kuat pada panjang gelombang di bawah 300 nm (Owen, 2000). Diagram blok UV-Vis dapat dilihat pada gambar 2.9 berikut ini.



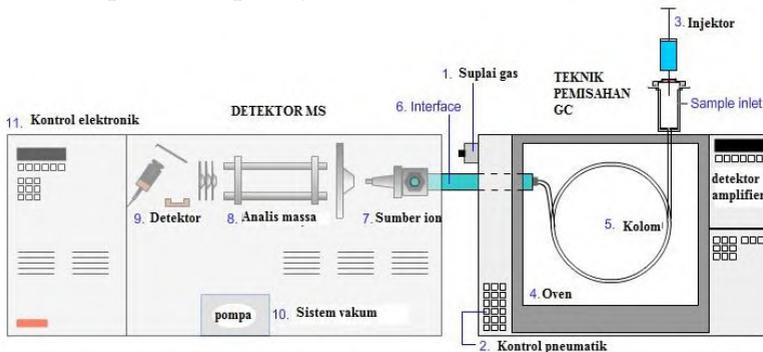
Gambar 2.9 Diagram Blok UV-Vis

(Owen, 2000).

Spektrofotometer pada dasarnya terdiri atas sumber sinar monokromator, tempat sel untuk zat yang diperiksa, detektor, penguat arus dan alat ukur atau pencatat. (Depkes RI, 1979).

2.11. GC-MS

Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS) atau kromatografi gas-spektroskopi massa merupakan metode yang menggabungkan kromatografi gas dan spektroskopi massa untuk mengidentifikasi zat dalam sampel. Metode analisis dilakukan dengan membandingkan konsentrasi massa atom dari spektrum yang dihasilkan (Nurhayati, 2008). Penampang diagram blok HPLC dapat dilihat pada gambar 2.10 berikut,



Gambar 2.10 Diagram blok GC-MS

(Watson, 2007).

Prinsip kerja dari GC-MS yaitu, arus elektron ditembakkan ke dalam suatu sampel sehingga terjadi pemisahan senyawa tersebut menjadi fragmen yang merupakan muatan ion dengan massa tertentu. Massa fragmen jika dibagi muatan disebut massa per muatan (M/Z), yang mewakili berat molekul fragmen. Fragmen tertentu difokuskan melewati celah menuju detektor oleh empat elektromagnet (quadropole) yang diprogram oleh komputer. Siklus quadropole disebut scan, yang berlangsung berkali-kali per detik. Selanjutnya komputer akan merekam grafik pada setiap scan, dan grafik ini disebut spektrum massa. Komputer GC-MS memiliki literatur spektrum untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang tidak diketahui dengan membandingkan spektrum massa dari komponen sampel dengan literatur (Nurhayati, 2008).

Aplikasi penggunaan GC-MS sangat luas, salah satunya adalah digunakan sebagai metode analisis residu pestisida (Raina, 2011). Metode kromatografi gas dipilih karena mampu mencapai sensitivitas tinggi selain KCKT. Dalam prosesnya, gas pembawa tidak bervariasi dan tidak membutuhkan pembuangan meskipun gas helium yang digunakan sebagai gas pembawa lebih murah dibandingkan dengan pelarut organik yang digunakan untuk KCKT (Watson, 2007).

BAB III

METODOLOGI

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Dalam penelitian ini digunakan peralatan dan instrumentasi berupa erlenmeyer berpenutup, spatula, spons, gelas ukur, gelas beker, pipet mikro, neraca digital, jarum ose, cawan steril, botol ampul, tabung falcon, oven, parafilm, suntikan, tabung oksigen, *ultrasonic cleaner*, *autoclave*, *autoshaker*, *homogenizer*, evaporator, detektor UV-Vis, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Jasco, Japan) dengan *intelligent pump* PU-1580 (Jasco, Japan), *multiwavelength detector* LG 1580-02 (Jasco, Japan), *autosampler* AS-950 (Jasco, Japan), kolom inertsil ODS-3 (150 mm) dengan diameter dalam 4,6 mm (GL Sciences, Japan), serta GC-MS merk Agilent Technologies 7890A GC System dengan kolom HP-5ms berukuran 30m x 250 μ m x 0,25 μ m, laju alir 3 ml/menit, suhu inlet 250°C, dan suhu kolom -59°C-320°C.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah jamur *G. trabeum*, bakteri *P. aeruginosa*, *potato dextrose agar* (PDA) (Merck), *potato dextrose broth* (PDB) (Becton Dickinson), *nutrient broth* (NB) (Merck), *nutrient agar* (NA) (Merck), *Dichloro Diphenyl Trichloroethane* (DDT), aseton (PT. Smart Lab Indonesia), aqua DM, piren, metanol (Merck), n-heksana (Fulltime), dan Na₂SO₄ anhidrat (Merck).

3.2. Regenerasi Jamur *Gloeophyllum trabeum*

Pada penelitian ini digunakan jamur pelapuk coklat dari spesies *G. trabeum*. Galur jamur diperoleh dari Kyushu University, Fukuoka, Jepang. Jamur diinokulasi ke dalam cawan steril yang berisi medium agar steril (PDA) dan diinkubasi pada suhu 30°C

selama 15 hari sampai seluruh permukaan medium agar tertutupi miselium.

3.3. Persiapan Kultur Cair Jamur

Jamur hasil regenerasi diinokulasikan menggunakan jarum ose (diameter 1 cm) ke dalam erlenmeyer yang berisi 10 mL media cair PDB, setelah itu di pre-inkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari.

3.4. Regenerasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri penghasil biosurfaktan dari spesies *P. aeruginosa* digunakan pada penelitian ini. Spesies bakteri ini diperoleh dari *NITE Biological Resource Center (NBRC, Japan)*. Bakteri diinokulasi kedalam cawan petri yang berisi medium agar (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 24 jam.

3.5. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*

Sebanyak 1 koloni bakteri hasil regenerasi diinokulasi ke dalam 10 ml NB, lalu diinkubasi pada suhu 37°C dan *dishaker* dengan kecepatan 180 rpm selama 24 jam. Setelah diinkubasi, bakteri diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 450 ml NB. Kemudian diukur *optical density* pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) dengan spektrofotometer UV-Vis setiap 1 jam sekali. Dibuat kurva dengan absorbansi sebagai fungsi waktu.

3.6. Persiapan Kultur Cair Bakteri

Sebanyak satu koloni bakteri yang terbentuk dari hasil regenerasi diinokulasikan ke dalam 52 ml media NB, lalu dilakukan pre-inkubasi bakteri pada suhu 37°C selama 20 jam dan *dishaker* dengan kecepatan 180 rpm.

3.7. Pembuatan Kurva Standar DDT

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 25, 50, 75, dan 100 % (100% = 0,25 μ mol DDT yang berasal dari 50 μ L DDT dengan konsentrasi 5 mM). Larutan standar diperoleh dengan mencampurkan DDT dengan 50 μ L piren sebagai internal standart.

Campuran kemudian ditambahkan 20 ml metanol dan 20 ml aqua DM. Selanjutnya campuran dilarutkan dengan *ultrasonic cleaner* dan dianalisis menggunakan HPLC dengan fasa gerak methanol : aqua DM + 1% TFA (82 : 18). Selanjutnya dibuat kurva dengan nilai perbandingan luas area puncak DDT/piren sebagai fungsi konsentrasi DDT.

3.8. Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum*

Kultur *G. trabeum* hasil pre-inkubasi selama 7 hari, masing-masing ditambahkan dengan 50 μL DDT dengan konsentrasi 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μmol). Tiap erlenmeyer diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip menggunakan parafilm untuk mencegah penguapan DDT. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C.

3.9. Biodegradasi DDT oleh Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri hasil pre-inkubasi selama 20 jam ditambahkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 10 mL PDB masing-masing sebanyak 1, 3, 5, 7, dan 10 ml. Tiap erlenmeyer ditambahkan 50 μL DDT dengan konsentrasi 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μmol) dan selanjutnya ditambahkan PDB hingga volume total menjadi 20 ml. Tiap erlenmeyer diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C.

3.10. Pengaruh Penambahan *Pseudomonas aeruginosa* Terhadap Biodegradasi DDT oleh *Gloeophyllum trabeum*

Kultur *G. trabeum* hasil pre-inkubasi, ditambahkan dengan kultur *P. aeruginosa* masing-masing 1, 3, 5, 7, dan 10 ml. Masing-masing kultur ditambahkan 50 μL DDT dengan konsentrasi 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μmol) dan ditambahkan PDB hingga volume total menjadi 20 mL. Selanjutnya ke dalam tiap erlenmeyer diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol, dilakukan degradasi DDT menggunakan media steril (tanpa penambahan bakteri).

3.11. Perolehan Ulang (*Recovery*) DDT dan Identifikasi Metabolit Produk

Untuk memperoleh hasil *recovery* DDT, ke dalam masing-masing kultur hasil inkubasi ditambahkan 20 ml metanol dan 50 μ L piren 5 mM kemudian dipindahkan ke dalam tabung falcon. Erlenmeyer yang digunakan selama proses inkubasi dicuci dengan 5 ml aseton sebanyak 2 kali dan dimasukkan kedalam tabung falcon. Setelah itu sampel dalam tabung falcon dihomogenizer.

Campuran kultur yang telah homogen kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman 41 diameter 90 mm. Residu (miselium) yang tersaring dikeringkan dan ditimbang untuk mengetahui berat biomassa, sedangkan supernatan ditampung kembali dan dimasukkan ke dalam labu bundar untuk dilakukan evaporasi.

Supernatan dievaporasi pada suhu 64°C hingga volume mencapai 15 ml, kemudian dituang ke dalam corong pisah, sedangkan labu bundar tempat supernatan dicuci dengan 50 ml air dan 50 ml n-heksana sebanyak 2 kali. Hasil pencucian dimasukkan ke dalam corong pisah untuk *dishaker* selama 15 menit. Fase aquos dan organik yang terbentuk dari proses ekstraksi tersebut dikeluarkan dan ditampung di tempat yang berbeda.

Fase aquos dari ekstraksi pertama dimasukkan kembali ke dalam corong pisah, sedangkan labu bundar dicuci dengan 20 mL air dan 50 mL n-heksana sebanyak 2 kali, kemudian dimasukkan kembali ke dalam corong pisah. Selanjutnya larutan dalam corong pisah *dishaker* selama 15 menit. Fase organik yang terbentuk pada ekstraksi kedua ditampung bersamaan dengan hasil fase organik yang terbentuk pada ekstraksi pertama.

Fase organik hasil dua kali ekstraksi disaring menggunakan kapas dan Na₂SO₄ anhidrat. Setelah disaring, filtrat dievaporasi kembali pada suhu 67°C hingga volume menjadi 5 ml. Filtrat diambil sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam botol vial yang ditandai sebagai vial pertama. Filtrat dalam vial pertama ini dianalisis menggunakan GC-MS merk Agilent Technologies 7890A GC System dengan kolom HP-5ms berukuran 30m x

250 μ m x 0,25 μ m, laju alir 3 ml/menit, suhu inlet 250°C, suhu kolom -59°C-320°C, dan laju aurite 1 ml/menit. Sedangkan filtrat yang tersisa dalam labu bundar dievaporasi kembali sampai kering dan ditambahkan 2 ml metanol. Selanjutnya, filtrat disonik sampai larut dan dimasukkan ke dalam botol vial yang ditandai sebagai vial kedua. Filtrat dalam vial kedua ini dianalisis menggunakan HPLC dengan perbandingan fase gerak methanol : aqua DM + 1% TFA (82 : 18).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kultur *Gloeophyllum trabeum*

4.1.1. Regenerasi Jamur *Gloeophyllum trabeum*

Pada penelitian ini digunakan galur jamur pelapuk coklat *G. trabeum* yang didapatkan dari Kyushu University, Fukuoka, Jepang. Sebelum dilakukan penelitian, mula-mula dilakukan regenerasi jamur *G. trabeum* untuk mencegah kematian akibat kehabisan nutrisi pada media yang lama. Regenerasi dilakukan dengan cara menginokulasikan *G. trabeum* menggunakan kawat ose steril ke dalam cawan petri berisi *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Digunakan media agar berupa PDA karena mengandung nutrisi (ekstrak kentang, glukosa, dan agar) yang mencukupi selama pertumbuhan jamur. Dalam 100 g kentang mengandung protein (2 g), lemak (0,1 g), karbohidrat (19,1 g), kalsium (11 mg), fosfor (56 mg), serat (0,3 g), zat besi (0,7 mg), vitamin B1 (0,09 mg), vitamin B2 (0,03 mg), vitamin C (16 mg), niasin (1,4 mg) dan energi (83 kal) (Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI, 1997). Protein digunakan sebagai sumber nitrogen yang akan dipecah menjadi asam amino untuk menghasilkan energi bagi sel (Volk dan Wheeler, 1993). Karbohidrat atau *dextrose* digunakan sebagai sumber karbon untuk menghasilkan energi yang digunakan sel jamur dalam metabolismenya. Unsur mineral seperti unsur makro (K, P, Ca, Mg) dan unsur mikro (Na, Mn, Co, Cu, Al) berfungsi sebagai pengatur tekanan osmose, kadar ion hidrogen dan permeabilitas suatu media dan juga kofaktor bagi enzim (Sumarsih, 2003). Unsur fosfor berperan dalam penyusunan membran plasma dan dibutuhkan sebagai komponen ATP, asam nukleat dan sejumlah koenzim seperti NAD, NADP dan flavin (Bimbi, 2012). Vitamin B kompleks digunakan sebagai koenzim dan katalisator (Ashari, 2014).

Keseluruhan proses inokulasi jamur dilakukan di dalam *laminary air flow* agar tidak terjadi kontaminasi pada jamur oleh mikroorganisme lain. Kemudian diinkubasi pada suhu 25°C dalam ruangan gelap untuk mengoptimalkan pertumbuhan miselium jamur. Pemilihan kondisi gelap dikarenakan jamur dapat tumbuh secara optimal dalam keadaan lingkungan yang minim cahaya (Djarajah dan Djarajah, 2001). Selama proses regenerasi, rutin dilakukan pengecekan pada jamur agar tidak terjadi kontaminasi. Pada gambar 4.1 menunjukkan bahwa setelah 15 hari, miselium jamur *G. trabeum* telah menutupi seluruh permukaan media agar dan siap untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.



Gambar 4.1 Kultur Jamur *Gloeophyllum trabeum* setelah proses regenerasi selama 15 hari

4.1.2. Persiapan Kultur Cair Jamur *Gloeophyllum trabeum*

Jamur *G. trabeum* yang telah diregenerasi diinokulasikan ke dalam media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB). Proses inokulasi dilakukan dengan cara mengambil jamur menggunakan jarum ose berdiameter 1 cm ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 20 mL media PDB steril. Keseluruhan proses inokulasi jamur dilakukan di dalam *laminary air flow* agar tidak terjadi kontaminasi pada jamur oleh mikroorganisme lain. Kemudian kultur *G. trabeum* dipre-inkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari untuk proses adaptasi kultur dengan media yang digunakan sehingga dapat memaksimalkan pertumbuhan jamur. Setelah pre-inkubasi 7 hari,

diperoleh miselium jamur *G. trabeum* yang siap untuk ditambahkan DDT.

4.2. Kultur *Pseudomonas aeruginosa*

4.2.1. Regenerasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Pada penelitian ini digunakan bakteri *P. aeruginosa* yang diperoleh dari NITE Biological Resource (NBRC, Jepang). Untuk proses regenerasi, *P. aeruginosa* diinokulasikan menggunakan jarum ose steril secara zig zag ke dalam cawan petri yang berisi Nutrient Agar (NA) steril. Sebelum digunakan, media agar disterilkan dengan cara diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Proses autoklaf dilakukan pada suhu 121°C karena pada suhu tersebut semua mikroorganisme (beserta spora dan hifanya) termasuk yang bersifat termofilik dapat mati (Yonidwita, 2012). Media NA mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan bakteri. NA terdiri atas pepton, ekstrak daging, NaCl, dan agar. Pepton berfungsi sebagai sumber nitrogen yang kaya akan nitrogen sederhana bebas. Vitamin B kompleks digunakan sebagai koenzim dan katalisator (Ashari, 2014). Ekstrak daging berfungsi sebagai zat hara untuk menyediakan karbohidrat, protein, vitamin B kompleks dan garam mineral (Sigmaaldrich, 2010). Karbohidrat merupakan sumber karbon penghasil energi yang diperlukan oleh bakteri selama pertumbuhan. Protein digunakan sebagai sumber nitrogen yang akan dipecah menjadi asam amino dan digunakan sebagai energi bagi sel (Volk dan Wheeler, 1993). NaCl berfungsi sebagai penyedia natrium, selain itu garam NaCl diperlukan untuk menaikkan tekanan osmosis dan keseimbangan psikokimia sel bakteri. Agar berfungsi sebagai pematid media (Sutama, 2000).

Keseluruhan proses inokulasi bakteri dilakukan di dalam *laminary air flow* agar tidak terjadi kontaminasi pada jamur oleh mikroorganisme lain. Ketika inokulasi, bakteri digoreskan secara zig zag untuk memperbanyak jumlah bakteri yang ditumbuhkan dalam media agar. Kemudian bakteri diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator. Suhu 37°C merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* (Mayasari, 2005). Setelah

proses inkubasi selama 24 jam, akan didapatkan koloni-koloni bakteri dari hasil regenerasi dan siap digunakan untuk penelitian selanjutnya. Gambar 4.2 menunjukkan koloni bakteri *P. aeruginosa* yang terbentuk setelah regenerasi.



Gambar 4.2 Kultur bakteri *P. aeruginosa*

4.2.2. Kurva Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*

Pertumbuhan didefinisikan sebagai penambahan jumlah sel dengan bertambahnya RNA, DNA, protein dan air. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan didefinisikan sebagai penambahan volume dan ukuran sel serta sebagai penambahan jumlah sel (Sumarsih, 2003). Pertumbuhan sel dapat diukur secara langsung dari massa sel dan secara tidak langsung dengan mengukur turbiditas cairan medium tumbuh (Mahreni, 2011). Pada penelitian ini dilakukan pengukuran secara tidak langsung dengan metode turbidimetri pada panjang gelombang 600 nm dan pengukuran dilakukan selama 48 jam dengan selang waktu 1 jam. Meningkatnya turbidimetri dalam media adalah indeks lain dari pertumbuhan bakteri serta jumlah biomassa bakteri. Sinar yang ditransmisikan atau diteruskan berbanding terbalik dengan jumlah populasi dalam media. Dengan kata lain, absorbansi yang terbaca dari sinar yang dihamburkan akan semakin besar saat sinar ditransmisikan menurun (Awwalurrizki, 2009). Prinsip dasar metode turbidimetri adalah apabila 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).

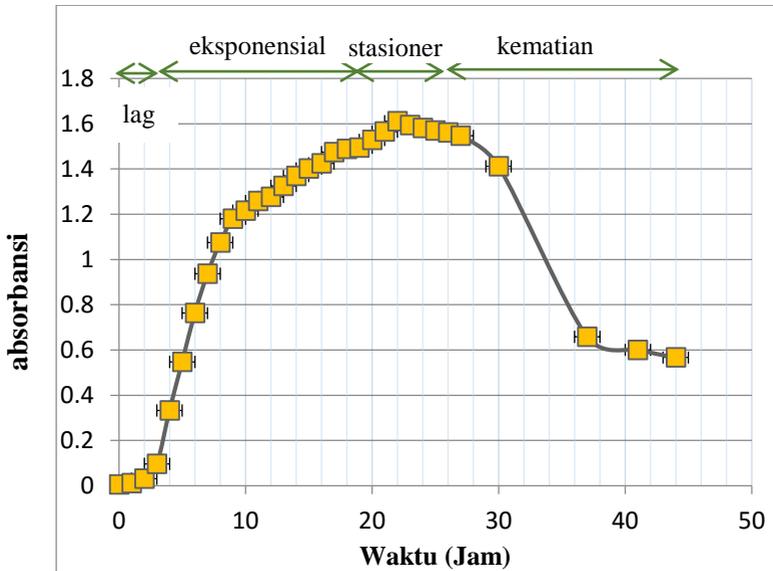
Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan menginokulasikan 1 koloni *P. aeruginosa* hasil regenerasi ke dalam 10 ml media *Nutrient Broth* (NB) steril. Inokulasi bakteri dalam 10 ml NB bertujuan agar sel bakteri dari media padat dapat beradaptasi pada media cair. Bakteri yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi di atas *rotary shaker* pada suhu 37°C selama 24 jam untuk meningkatkan kadar oksigen terlarut dalam media karena *P. aeruginosa* merupakan bakteri aerob. Bakteri yang telah diinkubasi kemudian dipindahkan ke dalam 450 ml media NB dan *dishaker* agar persebaran bakteri merata. Setelah itu dilakukan pengukuran secara tidak langsung dengan metode turbidimetri pada panjang gelombang 600 nm selama 48 jam dengan rentang waktu perhitungan setiap satu jam. Penggunaan panjang gelombang 600 nm didasarkan pada warna kultur, dimana 600-625 digunakan untuk kultur berwarna kuning-coklat (Ashari, 2014). Selain itu penggunaan panjang gelombang 600 nm juga didasarkan pada pembuatan kurva pertumbuhan *Escherichia coli* yang akan digunakan sebagai acuan untuk mengetahui konsentrasi dari *P. aeruginosa*, dimana

1 absorbansi *E. coli* $\approx 1 \times 10^9$ sel/mL kultur
 ≈ 1 mg/mL atau 1 g/L berat basah sel
 $\approx 0,25$ g/L berat kering sel
 (Hermansyah, 2014)

Sehingga,

1,528 absorbansi *P. aeruginosa* $\approx 1,528 \times 10^9$ sel/mL kultur
 $\approx 1,528$ mg/mL atau 1,528 g/L
 berat basah sel
 $\approx 0,382$ g/L berat kering sel

Pengukuran turbidimetri dari *P. aeruginosa* menghasilkan kurva pertumbuhan bakteri seperti pada gambar 4.3 di bawah ini.



Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan *P. aeruginosa*

Kurva pertumbuhan pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa *P. aeruginosa* mengalami 4 fase yaitu fase lag (adaptasi) pada jam ke 0-3, fase eksponensial pada jam ke 3-19, fase stasioner pada jam ke 19-27 dan fase kematian pada jam ke 27-44. Untuk pemilihan waktu panen dilakukan pada akhir fase eksponensial hingga masuk fase stasioner dikarenakan pada fase tersebut sel bakteri berada pada jumlah yang besar serta metabolit sekunder mulai diproduksi, sehingga berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut biomassa dapat dipanen pada jam ke 20 dengan absorbansi 1,514.

4.2.3. Persiapan Kultur *Pseudomonas aeruginosa*

Koloni *P. aeruginosa* hasil regenerasi diinokulasikan dengan menggunakan jarum ose ke dalam erlenmeyer yang berisi 20 mL media *Nutrient Broth* (NB) steril. Digunakan NB sebagai media cair karena mengandung nutrisi memadai yang dibutuhkan oleh bakteri. Kultur *P. aeruginosa* kemudian dipreinkubasi diatas *rotary*

shaker selama 20 jam pada suhu 37°C. Proses inkubasi selama 20 jam didasarkan pada hasil kurva pertumbuhan *P. aeruginosa* dimana pada jam ke 20 bakteri akan mengalami fase stasioner. Pada fase tersebut jumlah sel bakteri yang hidup dengan sel bakteri yang mati seimbang, serta terjadi optimalisasi produksi enzim dan biosurfaktan. Proses inkubasi dilakukan diatas *rotary shaker* bertujuan untuk meratakan sebaran bakteri dalam media serta untuk meningkatkan kadar oksigen dalam media, karena bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri aerob.

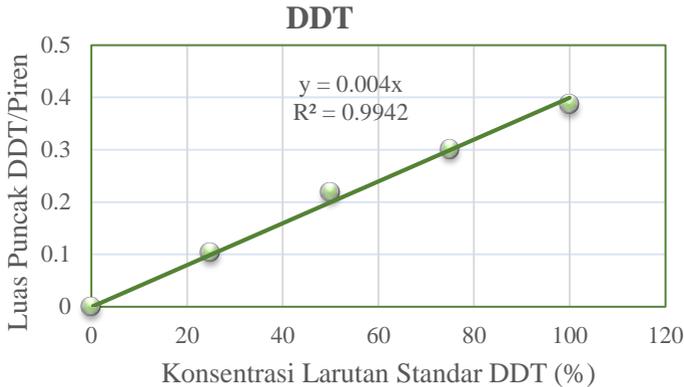
4.3. Kurva Standar DDT

Kurva standar DDT merupakan hasil plot nilai perbandingan luas puncak DDT/piren dengan konsentrasi larutan standar. Pembuatan kurva standar dilakukan dengan mengukur luas puncak DDT/piren dengan variasi konsentrasi larutan standar 0, 25, 50, 75 dan 100% (100% = 0,25 µmol DDT yang berasal dari 50 µL DDT 5 mM) menggunakan HPLC dengan fasa gerak methanol : aqua DM + 1% TFA (82 : 18).

Tabel 4.1 Data Kurva Standar DDT

Konsentrasi (%)	Luas Puncak Piren	Luas Puncak DDT	Perbandingan DDT/piren	Rata-rata	SD
0	0	0	0	0	0
	0	0	0		
25	81132,8	8133,85	0,100	0,104	0,006
	76696,94	8291,78	0,108		
50	80616,66	17689,29	0,219	0,219	0,001
	79033,15	17256,62	0,218		
75	79892,88	24232,41	0,303	0,301	0,003
	76780,01	22970,71	0,299		
100	76994,95	29698,65	0,386	0,387	0,002
	74100,91	28740,36	0,388		

Berdasarkan data pada tabel 4.1 dapat digambarkan grafik kurva standar DDT seperti pada gambar 4.4 berikut,



Gambar 4.4 Kurva Standar DDT

Pada Gambar 4.4 didapatkan persamaan regresi $y = 0,004x$, 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. Koefisien korelasi positif terbesar adalah 1 dan koefisien korelasi negatif terbesar adalah -1. Apabila dua variabel atau lebih memiliki nilai koefisien korelasi 1 atau -1, maka hubungan tersebut sempurna (Samsudin, 2005).

Hubungan signifikansi antara larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/piren dapat diketahui dengan melakukan uji t . Uji t dilakukan dengan tingkat signifikansi $\alpha = 0,05$ (dengan nilai selang kepercayaan 95%). H_0 menyatakan tidak adanya hubungan yang signifikan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/piren.

Sedangkan H_1 menunjukkan hubungan yang signifikan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/piren. Berdasarkan perhitungan pada lampiran 2 diketahui t_{hitung} lebih besar daripada t_{tabel} , sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/piren dan persamaan regresi linier kurva standar, sehingga dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi DDT dalam sampel.

4.4. Proses dan Hasil Biodegradasi DDT

4.4.1. Biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*

Kultur *G. trabeum* yang telah dipre-inkubasi ditambahkan DDT 50 μ L yang telah dilarutkan kedalam Dimetil sulfoksida (DMSO). DDT merupakan senyawa organik non polar yang memiliki berat jenis yang tinggi, sehingga kelarutannya dalam air relatif kecil. Oleh karena itu diperlukan pelarut aprotik seperti DMSO untuk meningkatkan kelarutan DDT dalam air (Ashari, 2014).

G. trabeum merupakan jamur aerobik yang membutuhkan oksigen dalam proses metabolismenya, sehingga perlu ditambahkan oksigen terlebih dahulu sebelum dilakukan inkubasi sebagai cadangan oksigen selama proses degradasi berlangsung. Selama proses inkubasi tabung erlenmeyer yang digunakan ditutup dengan penyumbat kaca dan diselotip untuk mencegah kontaminasi dari mikroorganisme lain. Kultur kemudian di *shaker* beberapa detik untuk meratakan sebaran DDT dalam kultur. Setelah itu kultur diinkubasi statis pada suhu 30°C selama 7 hari. Kultur *G. trabeum* dengan penambahan DDT yang telah diinkubasi statis dapat dilihat pada gambar 4.5 berikut ini.



Gambar 4.5 Inkubasi Sampel Degradasi DDT oleh *G. trabeum*.

Setelah proses inkubasi, dilanjutkan dengan proses *recovery* yang berfungsi untuk mengetahui jumlah DDT yang terdegradasi. Perlakuan pertama pada proses *recovery* yaitu penambahan 20 mL metanol dan 50 μ L piren ke dalam kultur. Penambahan piren berfungsi sebagai internal standar untuk menentukan DDT yang hilang selama proses degradasi. Sedangkan penambahan metanol berfungsi untuk menghentikan proses degradasi dan mematikan jamur *G. trabeum*. Kultur jamur yang telah mati kemudian dipindahkan kedalam tabung falcon yang sebelumnya telah dicuci dengan menggunakan aseton. Tabung erlenmeyer yang digunakan sebagai wadah pada proses inkubasi dibilas dengan 5 mL aseton sebanyak 2 kali dan dimasukkan kedalam falcon. Pembilasan erlenmeyer menggunakan aseton bertujuan untuk melarutkan senyawa polar dan non polar yang masih tertinggal didalamnya. Kultur jamur dalam falcon kemudian dihomogenisasi untuk membebaskan DDT yang masih terperangkap di dalam miselium jamur.

Campuran kultur yang telah homogen disaring menggunakan kertas saring Whatman dalam corong buchner dan divakum. Setelah miselium tersaring, filtrat ditampung dan

dievaporasi pada suhu 64°C untuk menghilangkan aseton dan metanol. Sedangkan residu yang terdapat pada kertas saring dikeringkan dan ditimbang untuk mengetahui berat biomassa.

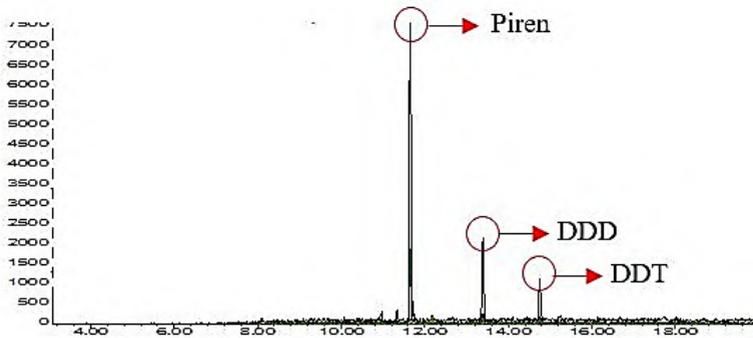
Setelah dievaporasi, campuran kultur diekstraksi dalam corong pisah dengan metode ekstraksi cair-cair. Prinsip dari metode ini adalah perbedaan kelarutan solut (komponen terlarut) dalam solven dan diluen (cairan pembawa). Labu bundar tempat sampel dicuci dengan air dan n-heksana. Pemilihan pasangan pelarut ini berdasarkan syarat-syarat pemilihan pelarut untuk ekstraksi cair-cair yaitu kedua pelarut tidak saling larut, tidak saling bereaksi, memiliki titik didih relatif rendah, tidak bersifat toksik, memiliki perbedaan densitas yang tinggi, tidak bereaksi dengan solut maupun diluen, memiliki perbedaan titik didih yang tinggi dengan solut, pelarut pertama mampu melarutkan diluen dan pelarut kedua mampu melarutkan solut. Air merupakan pelarut polar dan kelarutan DDT dalam air sangat kecil, sedangkan n-heksana merupakan pelarut non polar dan memiliki kemampuan melarutkan DDT. Selanjutnya, filtrat *dishaker* selama 15 menit. Fungsi pengocokan yaitu agar kedua pelarut saling kontak satu sama lain sehingga solut dapat terekstrak ke dalam fasa organik. Setelah proses pengocokan, akan muncul dua fasa yaitu fasa aquos dan fasa organik. Fase aquos dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam labu bundar, sedangkan untuk fase organik dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer.

Fase aquos dalam labu bundar dimasukkan kembali ke dalam corong pisah. Selanjutnya, labu bundar dicuci dengan 20 ml air dan 50 ml n-heksana sebanyak 2 kali. Kemudian *dishaker* selama 15 menit. Fase aquos dan organik yang terbentuk dari proses ekstraksi tersebut dikeluarkan dan ditampung di tempat yang berbeda. Selanjutnya, fase aquos diekstraksi kembali menggunakan corong pisah dengan metode yang sama seperti ekstraksi pertama. Fungsi dilakukan ekstraksi ulang yaitu untuk memaksimalkan hasil *recovery* dan memastikan bahwa tidak ada DDT dan metabolit produk tertinggal dalam fase aquos. Fase organik yang terbentuk pada ekstraksi kedua ditampung bersamaan

dengan hasil fase organik yang terbentuk pada ekstraksi pertama. Fase aquos sudah tidak diperlukan lagi.

Fase organik hasil ekstraksi disaring menggunakan kapas dan Na_2SO_4 anhidrat yang berfungsi sebagai agen pengering (*drying agent*). Setelah disaring, filtrat dievaporasi kembali pada suhu 67°C . Evaporasi ini berfungsi menguapkan n-heksana yang terkandung di dalam sampel. Kemudian filtrat diambil 2 ml dan dimasukkan ke dalam vial untuk dianalisis menggunakan GC-MS. Filtrat yang tersisa dievaporasi kembali sampai kering dan ditambahkan 2 ml metanol. Selanjutnya, filtrat disonik sampai larut dan dimasukkan ke dalam vial untuk dianalisis menggunakan HPLC. Hasil analisis degradasi DDT oleh *G. trabeum* menggunakan HPLC diperoleh data persentase DDT pada kultur kontrol dan perlakuan.

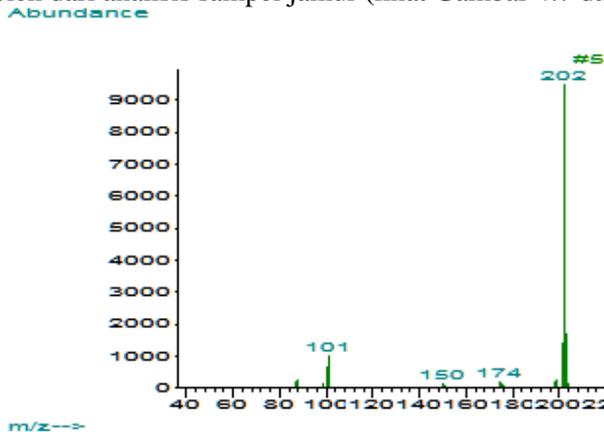
Pada sampel kontrol, terdeteksi DDT sebesar 96,70%. Pada sampel perlakuan yang telah diinkubasi statis selama 7 hari, diperoleh DDT yang tersisa dalam kultur (*recovery* DDT) sebesar 42,17%. Oleh karena itu, diketahui bahwa jamur *G. trabeum* dapat mendegradasi DDT sebesar 54,52% dengan standar deviasi (SD) 1,33. Data yang diperoleh tersebut merupakan rata-rata dari dua kali pengukuran ($n=2$). Setelah dianalisis menggunakan HPLC, sampel jamur dianalisis lebih lanjut menggunakan GC-MS untuk mengetahui intensitas dan waktu retensi metabolit DDT pada jamur *G. trabeum*. Hasil analisis kromatogram GC sampel jamur seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.6 mendeteksi beberapa senyawa antara lain piren pada waktu retensi 11,65 menit, DDT pada waktu retensi 14,74 menit, serta metabolit produk DDT berupa DDD pada waktu retensi 13,39 menit. Sehingga dapat diketahui bahwa metabolit produk hasil degradasi DDT menggunakan jamur *G. trabeum* adalah DDD.



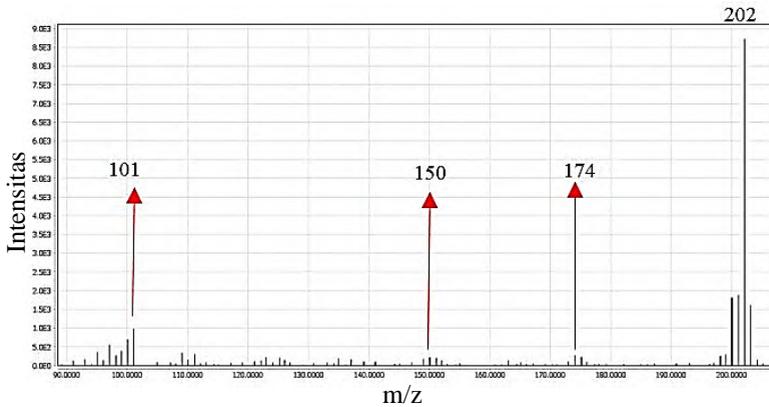
Gambar 4.6 Kromatogram GC sampel *G. trabeum*

Selanjutnya dilakukan pencocokkan M^+ yang diperoleh pada spektra MS masing-masing senyawa dalam sampel dengan M^+ secara teori dan yang ada dalam database untuk memastikan keakuratan identifikasi senyawa tersebut berupa piren, DDT, dan DDD.

Piren memiliki nilai M^+ sebesar 202. Nilai M^+ ini sesuai dengan spektra MS piren dalam database dan spektra piren yang diperoleh dari analisis sampel jamur (lihat Gambar 4.7 dan 4.8).



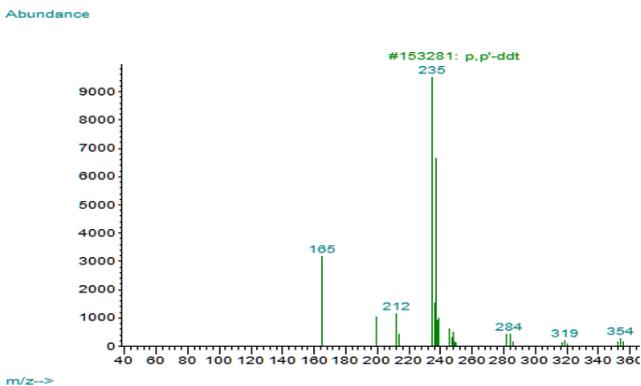
Gambar 4.7 Spektra MS Piren pada database



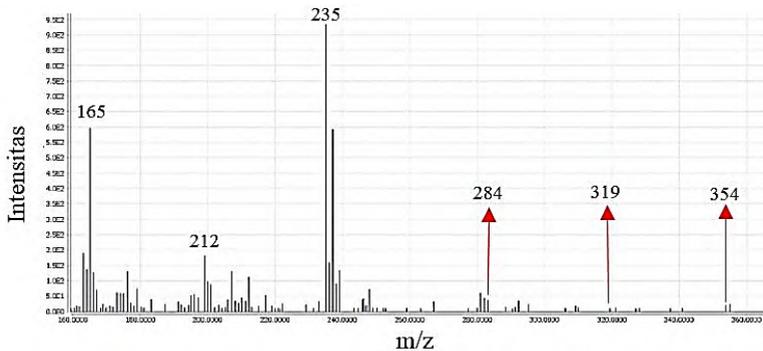
Gambar 4.8 Spektra MS Piren pada sampel Jamur *G. trabeum*

Seperti terlihat pada gambar 4.8, spektra MS piren hasil analisis sampel jamur memiliki beberapa puncak dengan nilai m/z yang sama dengan spektra MS piren dalam database. Berikut nilai m/z dari beberapa puncak pada spektra MS piren hasil analisis dengan spektra MS dalam database yang sama antara lain: 202 (*base peak*), 174, 150, dan 101.

DDT memiliki nilai M^+ sebesar 352. Nilai M^+ ini sesuai dengan spektra MS DDT dalam database dan spektra DDT yang diperoleh dari analisis sampel jamur (lihat Gambar 4.9 dan 4.10).



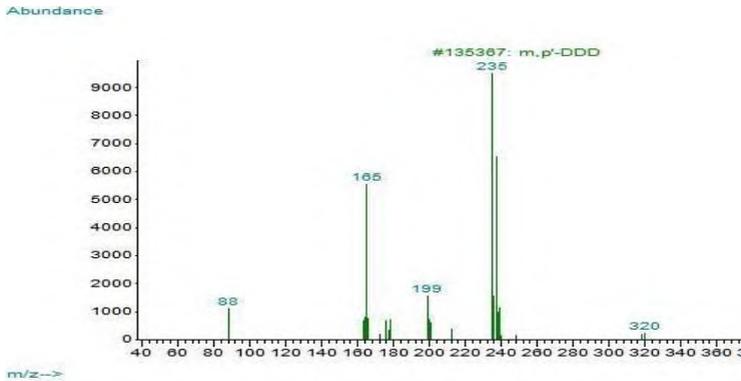
Gambar 4.9 Spektra MS DDT pada database



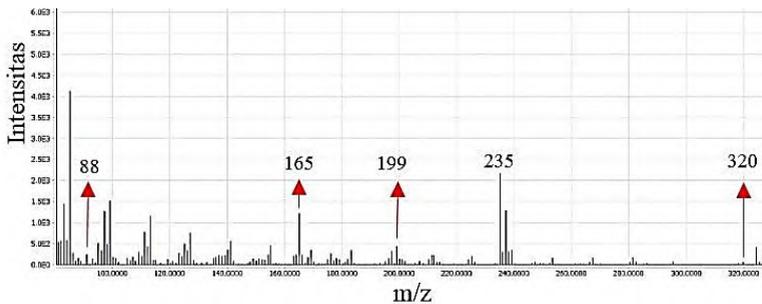
Gambar 4.10 Spektra MS DDT pada sampel Jamur *G. trabeum*

Seperti terlihat pada Gambar 4.10, spektra MS DDT hasil analisis sampel jamur memiliki beberapa puncak dengan nilai m/z yang sama dengan spektra MS DDT dalam database. Berikut nilai m/z dari beberapa puncak pada spektra MS DDT hasil analisis dengan spektra MS DDT dalam database yang sama antara lain: 235 (*base peak*), 165, 212, 284, 319, dan 354.

DDD merupakan senyawa turunan dari DDT yang telah kehilangan 1 atom Cl dan disubstitusi oleh atom hidrogen melalui reaksi deklorinasi, maka nilai M^+ DDD sebesar 320. Nilai M^+ ini sesuai dengan spektra MS DDD dalam database dan spektra DDD yang diperoleh dari analisis sampel jamur (lihat Gambar 4.11 dan 4.12). Seperti terlihat pada gambar 4.12, spektra MS DDD hasil analisis sampel jamur memiliki beberapa puncak dengan nilai m/z yang sama dengan spektra MS DDD dalam database. Berikut nilai m/z dari beberapa puncak pada spektra MS DDD hasil analisis dengan spektra MS DDD dalam database yang sama antara lain: 235 (*base peak*), 88, 165, 199, dan 320.



Gambar 4.11 Spektra MS DDD pada database



Gambar 4.12 Spektra MS DDD pada sampel Jamur *G. trabeum*

4.4.2. Biodegradasi DDT oleh Bakteri *P. aeruginosa*

Kultur *P. aeruginosa* yang telah dipreinkubasi selama 20 jam diambil sebanyak 1, 3, 5, 7 dan 10 ml (1 ml \approx $1,528 \times 10^9$ sel/ml kultur) dan masing-masing ditempatkan kedalam erlenmeyer yang berisi 10 ml PDB. Kemudian ditambahkan DDT 50 μ L dengan konsentrasi 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μ mol) dan ditambahkan media PDB hingga volume total menjadi 20 ml. *P. aeruginosa* merupakan bakteri aerobik yang membutuhkan oksigen dalam proses metabolismenya, sehingga sebelum dilakukan inkubasi perlu ditambahkan oksigen terlebih dahulu sebagai cadangan oksigen selama proses degradasi

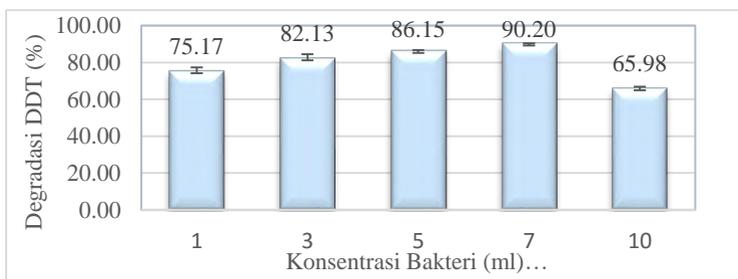
berlangsung. Selama proses inkubasi tabung erlenmeyer yang digunakan ditutup dengan penyumbat kaca dan diselotip. Kultur kemudian digoyang beberapa detik untuk meratakan sebaran DDT dalam kultur. Setelah itu kultur diinkubasi statis pada suhu 30°C selama 7 hari. Setelah masa inkubasi selesai, selanjutnya dilakukan proses *recovery* untuk mengetahui DDT yang terdegradasi.

Tabel 4.2 Jumlah degradasi DDT hasil biodegradasi oleh *P. aeruginosa* dengan waktu inkubasi selama 7 hari

Konsentrasi bakteri (ml)	Degradasi (%)*	Recovery (%)*	SD
1	75,17	21,53	2,06
3	82,13	14,57	2,34
5	86,15	10,54	0,51
7	90,20	6,49	0,16
10	65,98	30,72	0,87

*Data yang ditampilkan merupakan nilai rata-rata dari dua sampel (n=2)

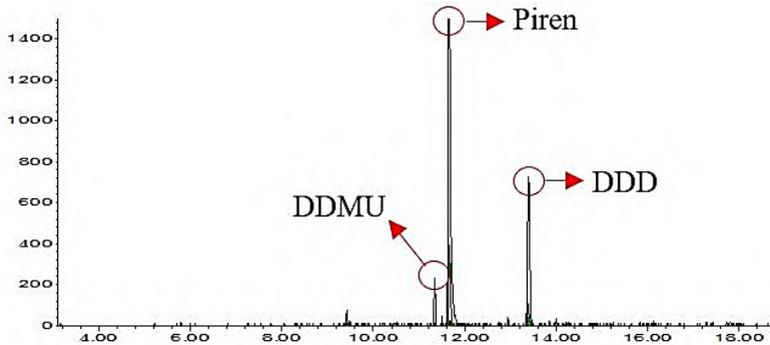
Pada tabel 4.2 menunjukkan jumlah DDT yang terdegradasi pada penambahan bakteri dengan konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 10 ml secara berurutan adalah sebesar 75,17 %, 82,13 %, 86,15 %, 90,20 %, dan 65,98 %. Dari data tersebut dapat disajikan dalam bentuk grafik seperti gambar 4.13 berikut,



Gambar 4.13 Jumlah DDT terdegradasi oleh *P. aeruginosa* dengan variasi konsentrasi bakteri yang diinkubasi selama 7 hari

Sesuai hasil HPLC sampel bakteri tersebut, setelah masa inkubasi statis selama 7 hari diperoleh hasil optimum degradasi DDT pada konsentrasi 7 ml dengan jumlah degradasi DDT sebesar 90,20%, recovery DDT sebesar 6,49%, dan standar deviasi 0,16.

Setelah dianalisis menggunakan HPLC, sampel bakteri dianalisis lebih lanjut menggunakan GC-MS untuk mengetahui intensitas dan waktu retensi metabolit DDT pada bakteri *P. aeruginosa*.



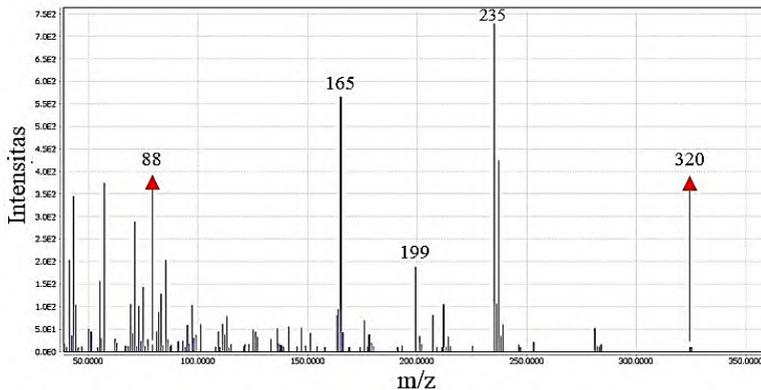
Gambar 4.14 Kromatogram GC sampel bakteri *P. aeruginosa*

Hasil analisis sampel bakteri menggunakan GC-MS seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.14 mendeteksi beberapa senyawa antara lain piren pada waktu retensi 11,67 menit, DDD pada waktu retensi 13,39 menit, dan DDMU pada waktu retensi 11,36 menit. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa metabolit produk hasil degradasi DDT dengan *P. aeruginosa* adalah DDD dan DDMU.

Selanjutnya dilakukan pencocokan M^+ yang diperoleh pada spektra MS DDD dalam sampel dengan M^+ secara teori dan yang ada dalam database (lihat pembahasan pada sub bab 4.4.1) untuk memastikan keakuratan bahwa metabolit produk tersebut adalah DDD dan DDMU.

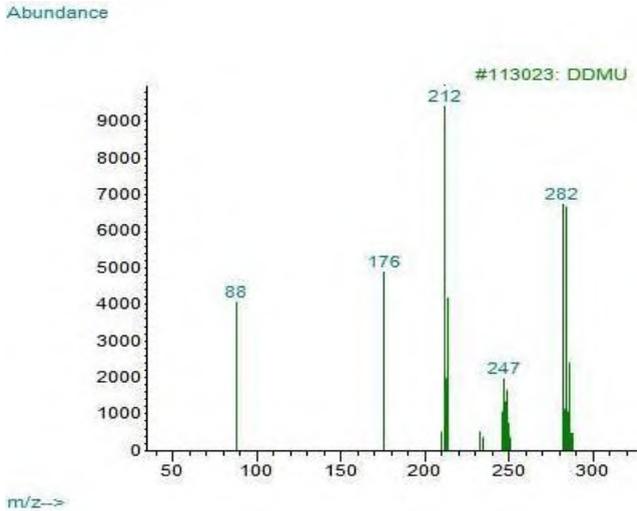
Seperti terlihat pada gambar 4.15, spektra MS DDD hasil analisis sampel bakteri memiliki beberapa puncak dengan nilai m/z yang sama dengan spektra MS DDD dalam database (lihat gambar 4.11). Berikut nilai m/z dari beberapa puncak pada spektra MS

DDD hasil analisis dengan spektra MS DDD dalam database yang sama antara lain: 235 (*base peak*), 88, 165, 199, dan 320.

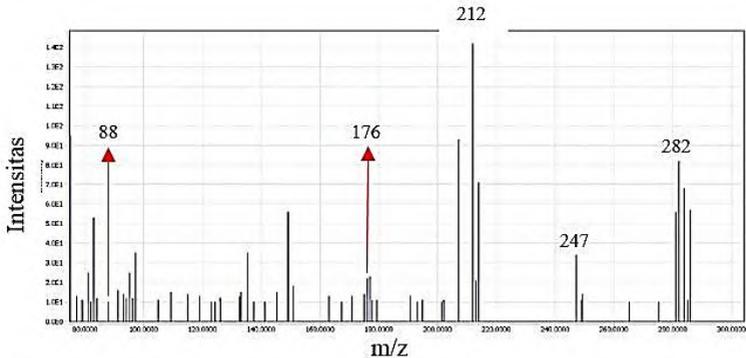


Gambar 4.15 Spektra MS DDD pada sampel *P. aeruginosa*

DDMU merupakan senyawa turunan dari DDD yang telah kehilangan 1 atom Cl dan 1 atom hidrogen melalui reaksi dehidroklorinasi, maka nilai M^+ DDMU sebesar 282. Nilai M^+ ini sesuai dengan spektra MS DDMU yang diperoleh dari database dan spektra DDMU hasil analisis sampel jamur (lihat gambar 4.16 dan 4.17). Selain itu, spektra MS DDMU hasil analisis sampel bakteri memiliki beberapa puncak dengan nilai m/z yang sama dengan spektra MS DDMU dalam database. Berikut nilai m/z dari beberapa puncak pada spektra MS DDMU hasil analisis dengan spektra MS dalam database yang sama antara lain: 282, 247, 212 (*base peak*), dan 176.



Gambar 4.16 Spektra DDMU pada database



Gambar 4.17 Spektra MS DDMU pada sampel *P. aeruginosa*

4.4.3. Pengaruh Penambahan *P. aeruginosa* terhadap Biodegradasi DDT oleh *G. trabeum*

Kultur *G. trabeum* hasil pre-inkubasi, ditambahkan dengan kultur *P. aeruginosa* masing-masing 1, 3, 5, 7, dan 10 ml. Tujuan dari penambahan bakteri ini ialah untuk mengoptimalkan jumlah DDT yang terdegradasi, hal ini karena *P. aeruginosa* mampu

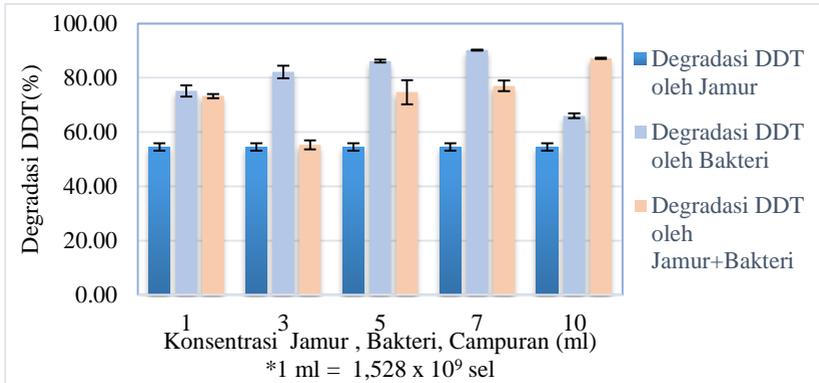
memproduksi biosurfaktan berupa rhamnolipid. Biosurfaktan merupakan senyawa aktif permukaan yang mampu menurunkan tegangan permukaan atau tegangan antar muka dua fasa. Oleh karena itu, rhamnolipid yang dihasilkan *P. aeruginosa* berfungsi sebagai agen pengemulsi yang meningkatkan kelarutan DDT dalam media kultur, sehingga ketersediaan DDT (*bioavailability*) untuk didegradasi oleh *P. ostreatus* semakin meningkat (Bidlan, 2003). Kemudian masing-masing kultur ditambahkan 50 μ L DDT dengan konsentrasi 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μ mol) dan ditambahkan PDB hingga volume total menjadi 20 mL. Selanjutnya ke dalam tiap erlenmeyer diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol, dilakukan degradasi DDT menggunakan media steril (tanpa penambahan bakteri). Setelah masa inkubasi selesai, selanjutnya dilakukan proses *recovery* untuk mengetahui DDT yang terdegradasi.

Tabel 4.3 Jumlah degradasi DDT hasil biodegradasi oleh campuran *G. trabeum* dan *P. aeruginosa* dengan waktu inkubasi selama 7 hari

Konsentrasi bakteri (ml)	Degradasi (%)*	Recovery (%)*	SD
1	73,24	23,46	0,77
3	55,22	41,47	1,66
5	74,66	22,04	4,43
7	77,00	19,70	1,97
10	87,12	9,57	0,22

*Data yang ditampilkan merupakan nilai rata-rata dari dua sampel (n=2)

Pada tabel 4.3 menunjukkan jumlah DDT yang terdegradasi pada campuran *G. trabeum* dengan penambahan *P. aeruginosa* dengan konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 10 ml secara berurutan adalah sebesar 73,24 %, 55,22 %, 74,66 %, 77,00 %, dan 87,12 %. Dari data tersebut dapat disajikan dalam bentuk grafik seperti gambar 4.18 berikut,



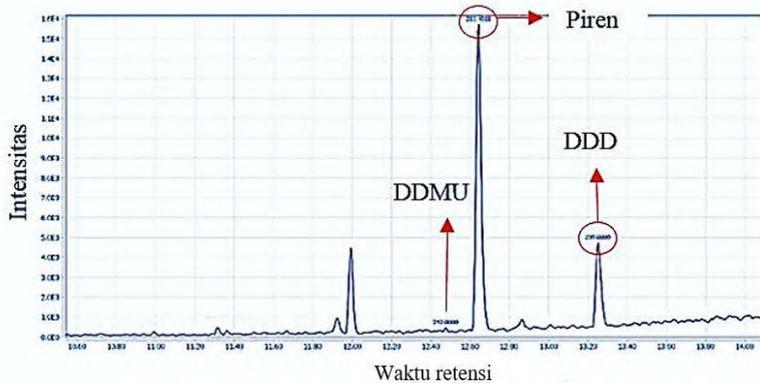
Gambar 4.18 Jumlah DDT terdegradasi oleh *P. aeruginosa* dengan variasi konsentrasi bakteri yang diinkubasi selama 7 hari

Sesuai hasil HPLC sampel campuran *G. trabeum* dan *P. aeruginosa* tersebut, setelah masa inkubasi statis selama 7 hari diperoleh hasil optimum degradasi DDT pada konsentrasi 10 ml dengan jumlah degradasi DDT sebesar 87,12 %, recovery DDT sebesar 9,57 %, dan standar deviasi 0,22.

Dari Gambar 4.18 dapat diketahui bahwa jumlah degradasi DDT oleh *G. trabeum* dengan penambahan *P. aeruginosa* cenderung meningkat jika dibandingkan dengan jumlah degradasi DDT oleh *G. trabeum* tanpa penambahan *P. aeruginosa*. Peningkatan jumlah degradasi ini terjadi karena adanya sinergitas antara *G. trabeum* dengan *P. aeruginosa*, hal ini karena *P. aeruginosa* memproduksi biosurfaktan berupa rhamnolipid (Datta, 2011). Biosurfaktan merupakan senyawa aktif permukaan yang mampu menurunkan tegangan permukaan atau tegangan antar muka dua fasa (Abalos dkk., 2001). Dengan adanya rhamnolipid yang berperan sebagai agen pengemulsi, kadar DDT yang terlarut dalam kultur mengalami peningkatan, oleh karena itu *G. trabeum* menjadi lebih mudah dalam mengakses DDT untuk didegradasi. Selain memproduksi biosurfaktan, bakteri ini juga mampu

melakukan metabolisme terhadap senyawa DDT (Golovleva dan Skryabin, 1980).

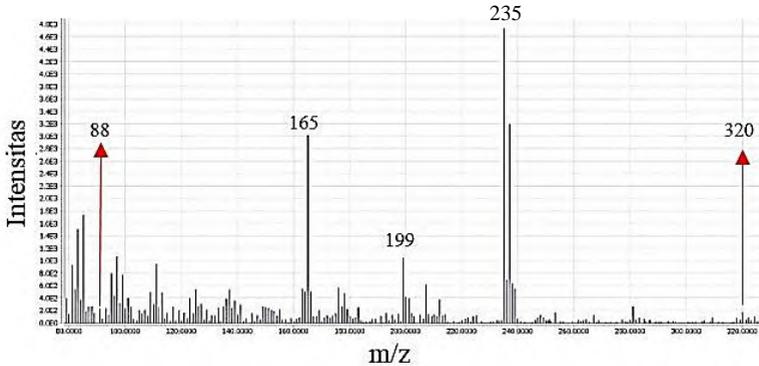
Setelah dianalisis menggunakan HPLC, sampel bakteri dianalisis lebih lanjut menggunakan GC-MS untuk mengetahui intensitas dan waktu retensi metabolit degradasi DDT pada campuran *G. trabeum* dan *P. aeruginosa*.



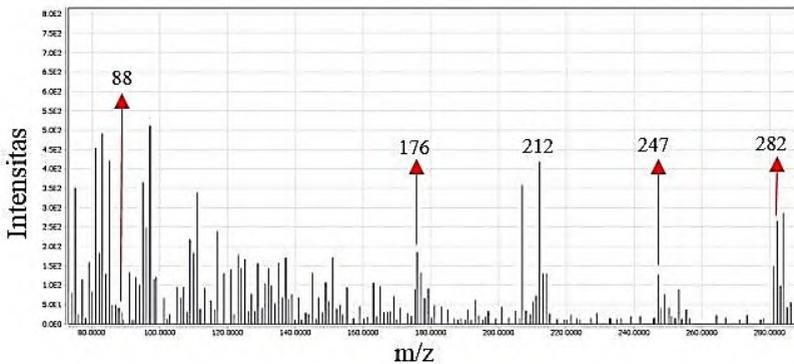
Gambar 4.19 Kromatogram GC sampel *G. trabeum* dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa*

Hasil analisis sampel campuran menggunakan GC-MS seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.19 mendeteksi beberapa senyawa antara lain piren pada waktu retensi 12,64 menit, metabolit produk degradasi DDT berupa DDMU pada waktu retensi 12,48 menit, dan DDD pada waktu retensi 13,25 menit.

Selanjutnya dilakukan pencocokkan M^+ yang diperoleh pada spektra MS DDD dalam sampel dengan M^+ secara teori dan yang ada dalam database (lihat pembahasan pada sub bab 4.4.1) untuk memastikan keakuratan bahwa metabolit produk tersebut adalah DDD dan DDMU.



Gambar 4.20 Spektra MS DDD sampel *G. trabeum* dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa*

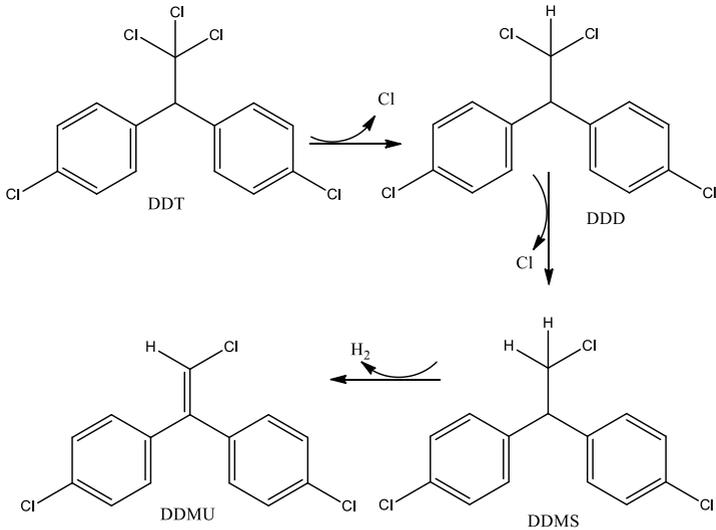


Gambar 4.21 Spektra MS DDMU sampel *G. trabeum* dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa*

Seperti terlihat pada gambar 4.20, spektra MS DDD hasil analisis sampel campuran memiliki beberapa puncak dengan nilai m/z yang sama dengan spektra MS DDD dalam database (lihat gambar 4.11). Berikut nilai m/z dari beberapa puncak pada spektra MS DDD hasil analisis dengan spektra MS dalam database yang sama antara lain: 235 (*base peak*), 88, 165, 199, dan 320. Sedangkan pada gambar 4.21, terlihat spektra MS DDMU hasil

analisis sampel campuran memiliki beberapa puncak dengan nilai m/z yang sama dengan spektra MS DDMU dalam database (lihat gambar 4.16). Berikut nilai m/z dari beberapa puncak pada spektra MS DDMU hasil analisis dengan spektra MS dalam database yang sama antara lain: 88, 176, 212 (*base peak*), 247, dan 282.

P. aeruginosa merupakan bakteri penghasil biosurfaktan. Biosurfaktan memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan surfaktan kimia seperti memiliki toksisitas rendah, kemampuan biodegradabilitas tinggi, kompatibilitas lingkungan lebih baik, dan potensial untuk diproduksi secara *in situ* (Helmy dkk, 2010). Biosurfaktan yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa* ini berperan sebagai agen pengemulsi yang meningkatkan kelarutan DDT dalam media kultur, sehingga ketersediaan DDT untuk didegradasi oleh *G. trabeum* semakin meningkat. Selain karena adanya pengaruh biosurfaktan, peningkatan degradasi DDT dalam media campuran dipengaruhi oleh adanya enzim pendegradasi yang dihasilkan oleh bakteri *P. aeruginosa*. Enzim pendegradasi yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa* adalah enzim dehidrogenase (Bidlan, 2003). Pada penelitian ini, diperoleh hasil berupa adanya peningkatan jumlah prosentasi degradasi DDT dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa* dibandingkan proses degradasi dengan hanya menggunakan jamur *G. trabeum*. Metabolit produk hasil degradasi DDT yang diperoleh adalah DDD dan DDMU. Merujuk pada Bidlan (2003), dapat dilihat jalur degradasi DDT menjadi DDD dan DDMU oleh bakteri dalam kondisi aerob melalui reaksi dehalogenasi dan dehidrogenasi seperti terlihat pada gambar 4.22 berikut ini.



Gambar 4. 22 Jalur Degradasi DDT menjadi DDD dan DDMU oleh bakteri aerobik

4.4.4. Jalur Degradasi

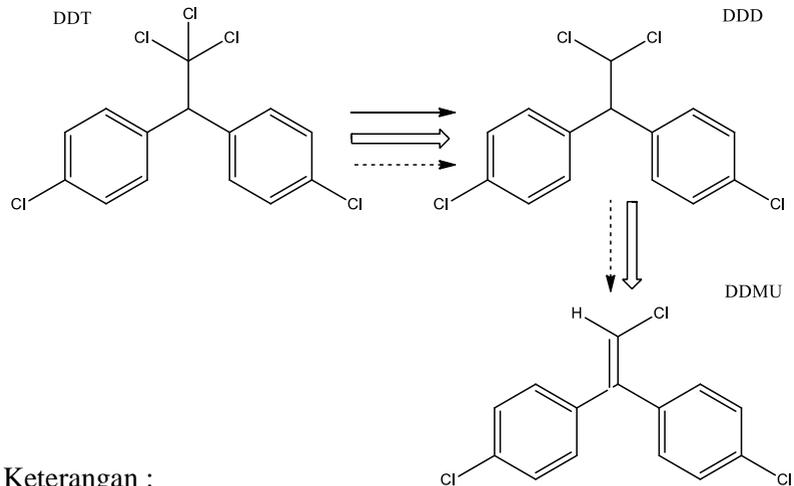
Dalam penelitian ini diperoleh beberapa metabolit produk dari hasil degradasi DDT pada masing-masing kultur. Seperti yang terlihat pada tabel berikut,

Tabel 4.4 Metabolit yang dihasilkan oleh masing-masing kultur

Metabolit produk / Kultur	DDD	DDMU
Jamur	ada	-
Bakteri	ada	ada
Jamur+Bakteri	ada	ada

Dari data yang diperoleh, dapat dibuat kemungkinan jalur degradasi yang terjadi pada proses degradasi DDT seperti pada Gambar 4.23. Degradasi DDT oleh *G. trabeum* menghasilkan

metabolit produk DDD. Degradasi DDT oleh *P. aeruginosa* menghasilkan metabolit produk DDD dan DDMU. Sedangkan pada penambahan *P. aeruginosa* pada degradasi DDT oleh *G. trabeum* menghasilkan metabolit produk DDD dan DDMU.



Keterangan :

→ : Jamur *G. trabeum*

--- → : Campuran

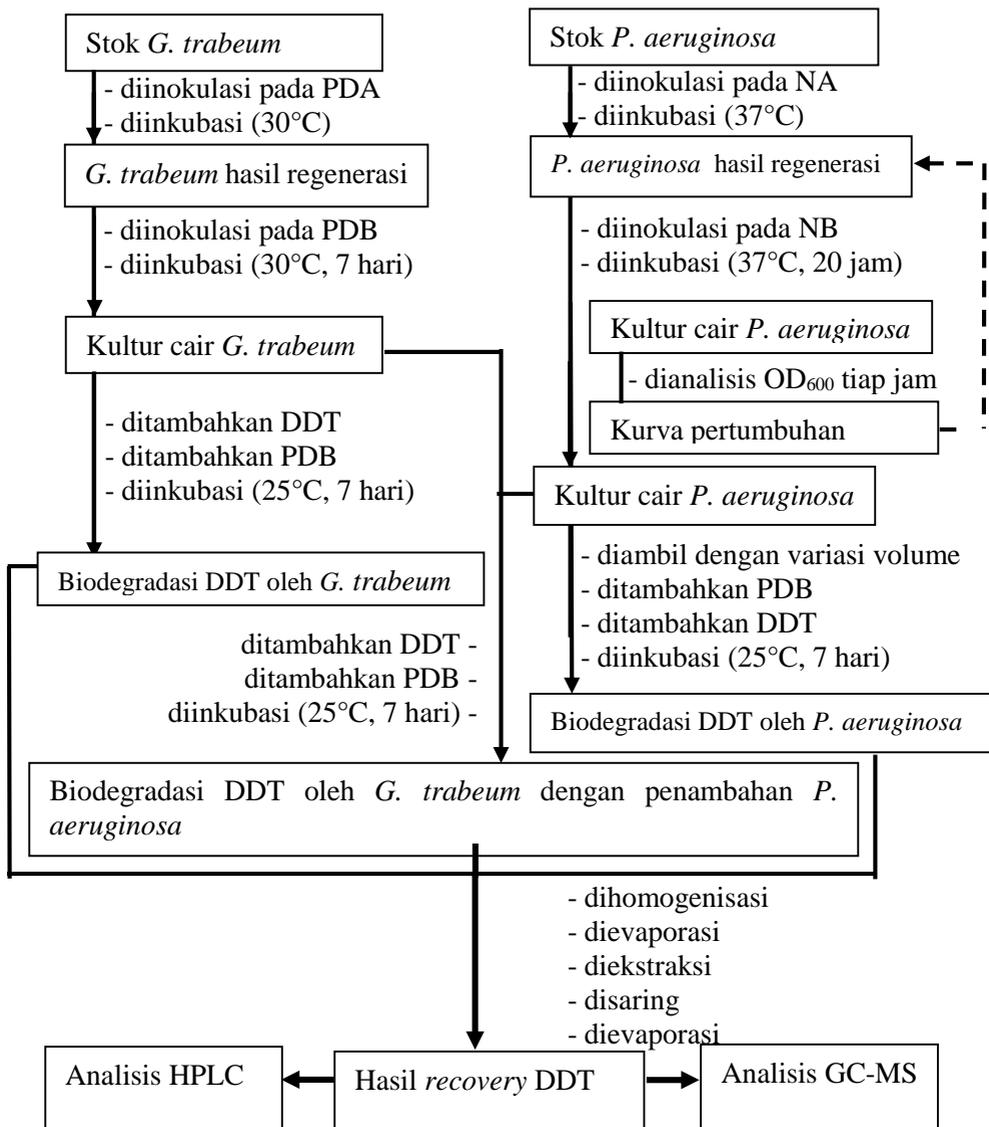
⇨ : Bakteri *P. aeruginosa*

Gambar 4.23 Jalur Degradasi DDT oleh *G. trabeum*, *P. aeruginosa* dan Campuran Keduanya

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja



Lampiran 2. Perhitungan

1. Pembuatan larutan DDT 5 mM dalam 50 ml DMSO

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

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

2. Pembuatan larutan piren 5 mM dalam 50 ml DMSO

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

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

3. Uji Signifikansi Koefisien Korelasi (Uji t)

X_i	Y_i	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$(Y_i - \bar{Y})$	$(Y_i - \bar{Y})^2$	$\frac{(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{(Y_i - \bar{Y})}$
0	0	-50	2500	-0,202	0,041	10,11
25	0,104	-25	625	-0,098	0,009	2,46
50	0,219	0	0	0,017	0,000	0
75	0,301	25	625	0,099	0,009	2,47
100	0,387	50	2500	0,185	0,034	9,25

$\bar{X} = 50$	$\bar{Y} = 0,202$		$\Sigma = 6250$		$\Sigma = 0,095$	$\Sigma = 24,28$
----------------	-------------------	--	-----------------	--	------------------	------------------

$$r = \frac{\sum [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\sqrt{\sum [(X_i - \bar{X})^2 (Y_i - \bar{Y})^2]}}$$

$$= \frac{24,275}{\sqrt{(6250)(0,095)}}$$

$$= 0,998$$

$$t_{hitung} = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$= \frac{0,998\sqrt{5-2}}{\sqrt{1-0,998^2}}$$

$$= 25,392 \quad (t_{tabel} = 2,78)$$

t_{tabel} H_0 diterima, jika $t_{hitung} < t_{tabel}$
 t_{tabel} H_0 ditolak, jika $t_{hitung} > t_{tabel}$
 Karena $t_{hitung} > t_{tabel}$, maka H_0 ditolak

4. Contoh Perhitungan Persen *Recovery*

Data analisis sampel kontrol (bakteri 1 mL)

Luas Puncak Piren	Luas Puncak DDT	Perbandingan Luas Puncak DDT/Piren	<i>Recovery</i>
76994,95	29698,65	0,3857 (0,39)	96,43
74100,91	28740,36	0,3878 (0,39)	96,96

*Analisis menggunakan HPLC

Persamaan regresi linear kurva standar DDT

$$y = 0,004 x$$

$$0,39 = 0,004 x \quad \text{Dimana : } y = \text{Perbandingan luas area puncak DDT/piren}$$

$$x = \frac{0,3878}{0,004} \quad x = \text{Persen } recovery$$

$$x = 96,96 \%$$

5. Perhitungan Pembuatan Kurva Standar DDT

- Pembuatan Larutan Standar DDT
 - 100 % = 50 μ L DDT 5 Mm
 - 75 % = 0,75 x 50 μ L DDT = 37,5 μ L
 - 50 % = 0,50 x 50 μ L DDT = 25 μ L
 - 25 % = 0,25 x 50 μ L DDT = 12,5 μ L
 - 0 % = 0 x 50 μ L DDT = 0
- Ditambahkan 50 μ L piren 5 Mm ke dalam masing-masing larutan standar DDT

Lampiran 3. Data Analisis Sampel

Tabel 1. Data Analisis Sampel Dengan Konsentrasi 1 ml Bakteri					
	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-Rata
C1	76995	29698,7	0,39	96,43	96,70
C2	74100,9	28740,4	0,39	96,96	
T1	3337,67	305,94	0,09	22,92	23,46
T2	14780,1	1418,91	0,10	24,00	
B1	22686,4	1821,1	0,08	20,07	21,53
B2	15296,7	1406,53	0,09	22,99	

Tabel 2. Data Analisis Sampel Dengan Konsentrasi 3 ml Bakteri					
	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-Rata
C1	76995	29698,7	0,39	96,43	96,70
C2	74100,9	28740,4	0,39	96,96	
T1	10024,1	1615,87	0,16	40,30	41,47
T2	9964,17	1699,81	0,17	42,65	
B1	5964,21	308,12	0,05	12,92	14,57
B2	3698,1	239,96	0,06	16,22	

Tabel 3. Data Analisis Sampel Dengan Konsentrasi Bakteri 5 ml					
	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-Rata
C1	76995	29698,7	0,39	96,43	96,70
C2	74100,9	28740,4	0,39	96,96	
T1	2179,39	219,44	0,10	25,17	22,04
T2	2141,03	161,88	0,08	18,90	

B1	6207,37	252,8	0,04	10,18	10,54
B2	5941,35	259,13	0,04	10,90	

Tabel 4. Data Analisis Sampel Dengan Konsentrasi Bakteri 7 ml					
	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-Rata
C1	76995	29698,7	0,39	96,43	96,70
C2	74100,9	28740,4	0,39	96,96	
T1	3413,85	288,01	0,08	21,09	19,70
T2	3706,2	271,28	0,07	18,30	
B1	1789101	45685	0,03	6,38	6,49
B2	2429672	64176	0,03	6,60	

Tabel 5. Data Analisis Sampel Dengan Konsentrasi Bakteri 10 ml					
	Piren	DDT	DDT/Piren	Recovery	Rata-Rata
C1	76995	29698,7	0,39	96,43	96,70
C2	74100,9	28740,4	0,39	96,96	
T1	7194,94	271,05	0,04	9,42	9,57
T2	4803,83	186,93	0,04	9,73	
B1	103173	12422,8	0,12	30,10	30,72
B2	92895,4	11643	0,13	31,33	

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pada penambahan bakteri *P. aeruginosa* sebanyak 10 ml dapat mengoptimalkan jumlah degradasi DDT oleh jamur pelapuk coklat *G. trabeum* dengan jumlah degradasi mencapai 87,12%. Degradasi DDT dengan campuran *G. trabeum* dengan *P. aeruginosa* lebih besar jika dibandingkan dengan *G. trabeum* saja dengan persentase degradasi sebesar 54,52%.
2. Metabolit produk yang dihasilkan pada proses degradasi DDT oleh jamur pelapuk coklat *G. trabeum* dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa* yaitu DDD dan DDMU.

5.2. Saran

Diharapkan pada penelitian selanjutnya dilakukan karakterisasi yang lebih lengkap untuk mengkonfirmasi metabolit produk yang dihasilkan sehingga dapat menentukan jalur degradasi yang dihasilkan dengan lebih detail serta mengetahui faktor-faktor lain yang dapat meningkatkan jumlah degradasi seperti suhu, pH dan waktu inkubasi. Selain itu juga dapat diteliti lebih lanjut mengenai peranan biosurfaktan dan spesifikasi enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dalam proses degradasi.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., Garcia, F., dan Manresa, A. (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir* 17, 1367–1371
- Ashari, K. (2014). Pengaruh Penambahan *Pseudomonas eruginosa* Terhadap Biodegradasi DDT Oleh *Pleurotus ostreatus*. Tugas Akhir. Jurusan Kimia FMIPA ITS
- Awwalurrizki, N. (2009). Hidrolisis Sukrosa dengan Enzim Invertase untuk Produksi Etanol Menggunakan *Zymomonas mobilis*. FMIPA ITS. Surabaya
- Bidlan, R. (2003). Studies on DDT degradation by bacterial strains. Thesis, Central Food Technological Research Institute.
- Bimbi, M. (2013). Tepung Sagu Sebagai Pemasat Media Kultur untuk Bakteri. Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang.
- Datta, S. (2011). Optimization of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. *Journal of Advanced Scientific Research* 2.
- Desai, J.D. dan Banat (1997). Microbial Production of surfactans and their commercial potential. *Microbial. Mol. Bi. Rev.* 1997 mar; 61 (1) : 47-64
- DitJen POM. (1995). Farmakope Indonesia. Edisi IV. Jakarta. Departemen Kesehatan RI. Hal. 769-771.

- Djarajah, N. dan Djarajah, A. (2001). *Budidaya Jamur Tiram*. Yogyakarta
- Djojosumarto, P. (2008). *Pestisida dan Aplikasinya*. PT. Agromedia Pustaka. Jakarta. 340p.
- Golovleva, L. dan Skryabin, G.K. (1980). Degradation of DDT and its analogs by *Pseudomonas aeruginosa* 640x. *Biology Bulletin Academy of Sciences of the USSR* 7, v.143–151(2)
- Gunawan, A.W. (2000). *Usaha Pembibitan Jamur*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Helmy, Q., E. Kardena, Z. Nurachman, Wisjnuprpto. (2010). Application of Biosurfactant Produced by *Azotobacter vinelandii* AV01 for Enhanced Oil Recovery and Biodegradation of Oil Sludge. *International Journal of Civil & Environment Engineering IJCEE*. Vol : 10 No : 01
- Hugh, R. dan Leifson, E. (1964). The Proposed Neotype Strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula
- Karina, S.B., de Moreno, Julia, E., de Moreno, Victor, J. (2002). Dynamics of Organochlorine Pesticides in Soils from a Southeastern Region of Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 22, pages 712-717
- Kosaric, N. (1992). Biosurfactant in Industry. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 64, No. 11, pp. 1731-1737, 1992. Britain.
- Lal, R. dan Saxena, D.M. (1982). Accumulation, metabolism, and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiological reviews* 46, 95.

- Lang, S. dan Wullbrandt, D. (1999). Rhamnose Lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbial Biotechnol.* 51: 22-32
- Lindsay, S. (1992) *High Performance Liquid Chromatography.* John Wiley & Sons Ltd. West Sussex.
- Manuaba, I.B.G. (2007). “Pengantar Kuliah Obstetri”. Jakarta: Buku Kedokteran EGC, 2007.
- Marrs, T.C., Ballantyne, B. dan Wiley, J. (2004). *Pesticide toxicology and international regulation.*, J. Wiley.
- Migula. (1900). The Proposed Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy.*, Vol. 14., No 2. Pp 69-84. Washington DC.
- Mulligan, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution* 133, 183–198.
- Mulligan, C.N. dan Gibbs, B.F. (1993). Factors influencing the economics of biosurfactants: Biosurfactants, Production, Properties, Applications. Marcel Dekker, New York, pp.329–371.
- Munson, J. W. (1991). *Analisis Farmasi Metode Modern*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Nurfina, A.Z. (1993). Upaya Mengurangi Pencemaran DDT Pada Lingkungan . *Cakrawala Pendidikan.* Edisi Khusus Dies Natalis. p 79-90

- Nurhayati. (2008). Reaksi Katalisis Oksidasi Stirena Menjadi Benzaldehida Menggunakan Katalis $\text{TiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ (1:1)-U dan $\text{TiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ (1:1)-PEG. FMIPA UI. Depok
- Olaf, C.G (2011). Fundamentals of Mold Growth in Indoor Environments and Strategies for Healthy Living. Springer Science and Business Media : US
- Owen, T. (2000). Fundamentals of Modern UV-visible Spectroscopy. Agilent Technologies. Germany
- 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 105, 614–621.
- Purnomo, A.S., Kondo, R., Mori, T., Takagi, K.. (2011). Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi. Journal of Biodeterioration and biodegradation. 691-695.
- Purnomo, A.S., Kondo, R., Mori, T., Takagi, K.. (2010). Involvement of Fenton reaction in DDT degradation by brown-rot fungi. Journal of Biodeterioration and biodegradation. 560-565.
- Purwoko, T. (2007). Fisiologi Mikroba. PT Bumi Aksara. Jakarta
- Putra, E. D. L. (2007). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi. Farmasi FMIPA USU. Medan.

- Roos, R.W. And Lau-Cam, C.A. (1986). General Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Separation of Drugs using Triethylamine as a Competing Base. Page. 403-418
- Soemirat. (2005). Toksikologi Lingkungan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Samsudin, A. (2005). Analisis Korelasi dan Regresi. FMIPA UPI. Bandung
- Sumardjo, D. (2008). Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata 1 Fakultas Bioeksakta. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta
- Sumarsih, S. (2003). Mikrobiologi Dasar. Fakultas Pertanian UPN Veteran. Yogyakarta
- Suprpti. (2011). Pedoman Pembinaan Penggunaan Pestisida. Direktorat Jenderal Prasarana dan Sarana Pertanian : Direktorat Jenderal Pupuk dan Pestisida. Kementerian Pertanian. Jakarta
- Tambunan, B. dan Nandika, D. (1989). Deteriorasi Kayu oleh Faktor Biologis. IPB Press. Bogor
- Tarumingkeng, R.C. (1992) Insektisida: sifat, mekanisme kerja dan dampak penggunaannya. Penerbit Ukrida
- Todar, K. (2004). Textbook of Bacteriology.
- Volk, Wesley A. dan Margaret F.W. (1993) *Mikrobiologi Dasar*. Jilid 1. Edisi kelima.: Erlangga. Jakarta.

Watson, J. T. (2007). Introduction to Mass Spectrometry : Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. Wiley and Sons, Ltd.

Yonidwita, Ciccliyliona D. (2012) Pengaruh pH Terhadap Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Lokal. FMIPA ITS. Surabaya

BIODATA PENULIS



Penulis bernama Nur Fajriyah Damayanti. Penulis yang dilahirkan di Tulungagung, 25 November 1992 ini merupakan anak bungsu dari tujuh bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal di TK Aisyiyah Tulungagung, SDN Kampung Dalem 06 Tulungagung, MTs Mu'allimaat Muhammadiyah Yogyakarta, dan MAN 2 Tulungagung. Penulis melanjutkan jenjang pendidikan S1 di Jurusan Kimia FMIPA ITS melalui jalur SNMPTN tulis dan terdaftar dengan Nomor Registrasi Pokok (NRP) 1411100090. Penulis pernah aktif sebagai staff Departemen Kaderisasi JMMI ITS (2012-2013), staff Kementerian Kominfo BEM ITS (2012-2013), Asisten Sekretaris Kementerian Kominfo BEM ITS (2013-2014), dan Menteri Keuangan BEM ITS (2014-2015). Penulis menyelesaikan program Sarjana dengan mengambil tugas akhir di bidang Kimia Mikroorganisme dibawah bimbingan Bapak Adi Setyo Purnomo, M.Sc, Ph.D. Penulis dapat dihubungi melalui email : fajriyahdamayanti@yahoo.com.